

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Lukáš Landsmann

Úloha SIRT1 během zrání oocytů v podmínkách *in vitro*
The role of SIRT1 during *in vitro* maturation of oocytes

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.08.2018

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce **Ing. Janu Nevoralovi Ph.D.** za odborné vedení, obrovskou trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval v průběhu zpracování diplomové práce. Poděkování patří také celému týmu Laboratoře reprodukční medicíny a zvláště pak mé kolegyni Mgr. Miriamě Štiavnické a Ing. Petru Hoškovi Ph.D.. V neposlední řadě bych rád poděkoval celé své rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

Abstrakt:

SIRT1 je histon deacetyláza působící na své epigenetické i ne-epigenetické cíle. Předpokládáme, že SIRT1 je zapojen do procesu zrání oocytů a to především v ooplazmě oocyty, která ovlivňuje další osud zralého oocyty a vzniklého embrya. Naší hypotézou je, že ve zralém oocyty působí SIRT1 jako signální molekula přes specifickou epigenetickou a ne-epigenetickou regulaci. Pozorovali jsme re-lokalizaci SIRT1 ve zralém oocyty a následně jeho spojitost s mikrotubuly vřeténka. Ve zralém oocyty SIRT1 vytváří vřeténku podobný vzor. Tato specifická vazba SIRT1 na vřeténko podporuje snížení acetylace α -tubulinu. Na základě pozorování histonového kódu v nezralých a zralých oocytech jsme potvrdili, že SIRT1 je převážně předurčen pro epigenetické působení v zárodečném váčku (GV) nezralého oocyty. V souladu s tímto tvrzením jsme potvrdili, že SIRT1 řídí trimethylaci histonu H3 na lyzinu K9 ve zralém oocyty, kterou považujeme za dědičnou napříč meiotickým zráním. Souhrnně naše pozorování poukazuje na dvojí efekt SIRT1 v oocytech v závislosti na kontextu meiotické progrese, kdy dochází k přepínání epigenetického a ne-epigenetického působení SIRT1 během progresu meiotického zrání.

Klíčová slova: oocyt, SIRT1, histon, vývojová kompetence, tubulin, epigenetika

Abstract

SIRT1 histone deacetylase acts towards many epigenetic and non-epigenetic targets. The involvement of SIRT1 in oocyte maturation is assumed and the importance of ooplasmic SIRT1 pool for further destiny of matured oocyte is strongly suggested. We hypothesized that SIRT1 play role of the signal molecule in mature oocyte through selected epigenetic and non-epigenetic regulation. We observed SIRT1 re-localization in mature oocyte and the association with spindle microtubules. In matured oocyte, SIRT1 shows a spindle-like pattern and spindle-specific SIRT1 action is supported decreasing α -tubulin acetylation. Based on the observation of histone code in immature and matured oocytes, we suggest that SIRT1 is mostly predestined for epigenetic mode of action in germinal vesicle (GV) of immature oocyte. Accordingly, SIRT1-driven trimethylation of histone H3 on lysine K9 in matured oocyte is considered to be an inheritance of GV epigenetic transformation. Taken together, our observations point out the dual spatiotemporal SIRT1 action in oocyte capable to be switched from epigenetic to the non-epigenetic mode of action readily depending on meiosis progress.

Keywords: oocyte, SIRT1, histone, developmental competence, tubuline, epigenetics

Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod.....	3
3	Literární přehled.....	4
3.1	Oogeneze.....	4
3.1.1	Primordiální zárodečné buňky	4
3.1.1.1	Vznik a migrace PGCs.....	4
3.1.1.2	Vstup oogonií do meiózy	5
3.2	Folikulogeneze.....	5
3.2.1	Vznik folikulů	6
3.2.2	Růstová fáze folikulu.....	6
3.2.3	Metabolické změny během folikulogeneze	8
3.3	Oogeneze v postnatálním životě	8
3.4	Regulace folikulogeneze	9
3.4.1	Parakrinní signalizace	9
3.4.1.1	TGF- β	9
3.4.1.2	Růstové faktory EGF a IGF-1	10
3.4.1.3	GDF-9	11
3.4.2	Další faktory hrající roli při folikulogenezi	11
3.5	Maturace oocyty a získání vývojové kompetence.....	12
3.5.1	Meiotická a cytoplazmatická kompetence oocyty	12
3.5.2	Morfologická kompetence oocyty.....	13
3.5.3	<i>In vitro</i> maturace	14
3.6	Regulace meiózy.....	15

3.6.1	Kontrola hladiny cAMP	15
3.6.2	Kontrola hladiny cGMP.....	15
3.6.3	MPF (M-phase/Maturation Promoting Factor).....	16
3.7	Epigenom oocyty	17
3.7.1	Epigenetické změny v průběhu oogeneze	18
3.7.1.1	Methylace DNA a histonů během genového imprintingu	18
3.7.1.2	Acetylace histonů ve zrajícím oocyty.....	20
3.7.1.3	Konfigurace chromatinu v oocyty	21
3.8	Sirtuiny.....	21
3.8.1	Reakční mechanismus	22
3.9	SIRT1	23
3.9.1	Knock-out SIRT1 (SIR2a)	23
3.9.2	Inhibitory a aktivátory SIRT1	24
3.9.3	Vliv resveratrolu na kvalitu oocytů	25
3.9.4	Cíle SIRT1 signalizace	26
3.9.4.1	p53 a apoptóza buněk	26
3.9.4.2	mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin).....	27
3.9.4.3	FoxO.....	28
3.9.4.4	SUV39H1a MDM2	29
3.9.4.5	Deacetylace a acetylace mikrotubulů	30
4	Cíle práce	32
5	Materiál a metody.....	32
5.1	Modelový organismus.....	33
5.2	Metody.....	34
5.2.1	<i>In vitro</i> maturace	34
5.2.2	Fixace a imunocytochemie.....	34

5.2.3	TUNEL assay	35
5.2.4	Analýza obrazu a ko-lokalizace	35
5.2.5	Western blot	36
5.2.6	Statistická analýza.....	36
6	Výsledky	37
6.1	Re-lokalizace SIRT1 během meiotického zrání oocyty	37
6.2	SIRT1 ve zralém oocyty vykazuje vzor dělicího vřeténka	39
6.3	Porovnání aktivační schopnosti aktivátorů SIRT1.....	41
6.4	<i>In vitro</i> zrání oocytů v přítomnosti aktivátoru BML-278.	42
6.5	SIRT1 snižuje acetylaci α -tubulinu vřeténka ve zralého oocyty.....	43
6.6	SIRT1 moduluje epigenom u zralého oocyty	44
6.7	SIRT1 ovlivňuje histonový kód v GV oocyty	48
7	Diskuze	51
8	Souhrn.....	55
9	Seznam literatury	56

1 Seznam zkratek

AMH	Anti Müllerian Hormone	Anti-müllerian hormon
ART	Assisted Reproductive Technology	Techniky asistované reprodukce
APC	Anaphase-Promoting Complex	Anafázi podporující komplex
AREG	Amphiregulin	Amphiregulin, růstový faktor
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	Ataxia telangiectasia mutant, serin/threoninová kináza
BAX	Bcl-2-Associated X Protein	
BMP	BMP – Bone Morphogenetic Protein	Kostní morfogenetický protein
BRCA	Breast Cancer Susceptibility Gene	
BTC	Betacellulin	Betacellulin. růstový faktor
CBP	cAMP-Response Element-Binding Protein-Binding Protein	Transkripční koaktivátor
CDC (CDK)	Cyclin Dependent Kinases	Cyklin dependentní kináza
CDC25B	Cell Division Cycle 25B	Fosfatáza
CHK2	Checkpoint Kinase 2	Checkpoint kináza 2
c-kit		Receptor s tyrosin kinázovou aktivitou
CpG	Cytosin – Phosphate – Guanine	Cytosin-fosfát-guanin
DNMT	DNA Methyltransferase	DNA methyltransferáza
EGF	Epidermal Growth Factor	Epidermální růstový faktor
EHMT	Euchromatin-Histone-Lysin N-Methyltransferase	histon methyltransferáza
EREG	Epiregulin	Epiregulin, růstový faktor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases	Signální dráha
EZH 2	Enhancer of Zeste Homolog 2	Histon methyltransferáza
FGSCs	Female Germline Stem Cells	Samičí zárodečná linie kmenových buněk
FoxO	Forkhead-Box	Rodina transkripčních faktorů
FSH	Follicle Stimulating Hormone	Folikuly stimulující hormon
GDF–9	Growth Differentiation Factor – 9	Růstový diferenciační faktor 9
GV	Germinal Vesicle	Zárodečný váček
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown	Rozpad zárodečného váčku
H	Histone	Histon
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	Lidský choriový gonadotropin
HDAC	Histone Deacetylases	Histon deacetyláza
HP1	Heterochromatin Protein 1	Heterochromatinový protein 1
IVM	<i>In Vitro</i> Maturation Oocytes	<i>In vitro</i> maturace oocytů
IVO	<i>In Vivo</i> Maturation Oocytes	<i>In vivo</i> maturace oocytů

IGF-1	Insulin – Like Growth Factor – 1	Inzulínu podobný růstový faktor 1
Kit		Ligand c-kit receptoru
LH	Luteinizing Hormone	Luteinizační hormon
Lys (K)	Lysine	Lyzin
MAPK	Mitogen - Activated Protein Kinase	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDM2	Mouse Double Minute 2	Ubiquitin ligáza E3
MnSOD	Manganese Superoxid Dismutase	Mangan – dependentní superoxid dismutáza
MPF	M-Phase Promoting Factor	M-fázi/zrání podporující faktor
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	
NPPC	Natriuretic Peptide Precursor	C-typ natriuretického peptidu
NPR2	Natriuretic Peptide Receptor 2	Natriuretický peptidový receptor 2
NSN	Non – Surrounded Nucleolus	Konfigurace chromatinu
OCT4	Octamer – Binding Transcription Factor 4	Oktamer – vazebný transkripční faktor 4
PGCs	Primordial Germ Cells	Primordiální zárodečné buňky
PKA	Protein Kinase A	Protein kináza A
SIR2	Silent Information Regulator	Histon deacetyláza u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nebo celá rodina sirtuinů
SIRT1(SIR2a)	SIRTUIN 1	SIRTUIN 1
SMAD		Signální transduktor pro TGF- β signalizaci
SN	Surrounded Nucleolus	Konfigurace chromatinu
SUV39H1	Suppressor of Variegation 3-9 Homologue 1	Histon methyltransferáza
TGF- β	Transforming Growth Factor – Beta	Transformující růstový faktor beta
TSA	Trichostatin A	Trichostatin A, inhibitor histon deacetyláz
TSC	Tuberous Sclerosis Complex	GTPáza aktivující protein

2 Úvod

Se zvyšujícím se věkem ženy klesá procento úspěšného početí zdravého jedince. Naopak se zvyšuje počet potratů a genetických poruch (Hassold and Chiu, 1985). Faktor genetiky nemusí být vždy přítomný, může se jednat o reprodukční neschopnost z nejasných příčin. Neplodnost u ženy je spojena se špatnou kvalitou oocytů, projevující se chromozomálními, morfologickými a funkčními abnormalitami. S věkem klesá folikulární rezerva a s tím i počet kvalitních oocytů s adekvátní vývojovou kompetencí (Malhi et al., 2007). Přibližně 50 % oocytů je aneuploidních u žen starších 35 let. Známkou reprodukčního stárnutí u žen je zvýšená hladina FSH v krvi (Klein et al., 1996). S odkládáním mateřství je spojeno zvýšené riziko neplodnosti, které do velké míry řeší techniky asistované reprodukce (ART). Postupy ART, založené na *in vitro* manipulaci a oplození oocytů, ovšem vykazují nestabilní výsledky a mnohdy řeší problém pouze v omezené míře (Habbema et al., 2009).

Klíčovým fyziologickým procesem pro oocyt je fáze zrání. V některých případech se ART uchyluje k *in vitro* zrání (maturaci) oocytů v laboratorních podmínkách. Tyto podmínky však lze označit za suboptimální a tak *in vitro* maturace (IVM) mnohdy vede k negativním změnám, které vedou k snížené úspěšnosti *in vitro* oplození a časného embryonálního vývoje (Denomme and Mann, 2012; Schramm et al., 2003). Léčba je však především závislá na zisku kvalitních zralých oocytů. Z tohoto důvodu je maturace oocytů intenzivně studovaná s cílem popsat, nalézt a využít protektivní látky a jejich proteinové cíle s výsledkem vyšší úspěšnosti ART.

Sirtuiny jsou rodinou NAD⁺-dependentních histon deacetyláz. Sirtuiny jsou v poslední době studovány v různých souvislostech pro fyziologii oocyty významných. Jeden z nejvíce studovaných členů rodiny Sirtuinů je Sirtuin 1 (SIRT1). SIRT1 ovlivňuje řadu biologických procesů, ve kterých má ve většině případů protektivní účinky, například při ochraně před oxidativním stresem. SIRT1 působí jako epigenetický i ne-epigenetický modulátor.

Z dokonalením ART a porozumění role SIRT1 během *in vitro* zrání oocyty, může přinést zvýšení úspěšnosti v léčbě neplodnosti. A to nejen u metody *in vitro* zrání, ale i v dalších používaných metodách v oblasti ART.

3 Literární přehled

3.1 Oogeneze

Samičí pohlavní buňky oocyty vznikají buněčným mechanismem zvaným oogeneze. Oogeneze popisuje proces, kdy na počátku stojí primordiální zárodečné buňky (PGCs, Primordial Germ Cells) a na konci terminálně diferencované haploidní pohlavní buňky, připravené k fúzi gamet. U savců je samotná meióza dokončena vyloučením druhého pólóvého tělíska během oplození oocyty spermií.

K separaci buněk zárodečné linie od somatické linie dochází u většiny organismů v časném embryonálním vývoji. U myši jsou detekovány PGCs během časně gastrulace v 7,25E jako pozitivní buňky na alkalickou fosfatázu (Ginsburg et al., 1990). Člověku blízký modelový organismus je myš *Mus musculus*. Z pohledu reprodukční biologie patří myší model k jednomu z nejvíce zkoumaných modelových organismů společně s modelem prasete a skotu.

Počet vzniklých folikulů je závislý na rovnováze mezi oocyty a okolními somatickými buňkami, stejně tak na proliferaci samotných zárodečných buněk. V ovariu tvořeném primordiálními folikuly dochází k redukci počtu zárodečných buněk a to u více jak 40% (Rodrigues et al., 2009). Tímto způsobem jsou pravděpodobně eliminovány nekvalitní oocyty. Samotný mechanismus redukce je řízen programovanou buněčnou smrtí (Kerr et al., 2006). Během života dochází k fyziologickému snižování počtu primordiálních folikulů až do období menopauzy. Jakákoliv odchylka během vzniku nebo vývoje pohlavních buněk může vést k neplodnosti jedince.

3.1.1 Primordiální zárodečné buňky

3.1.1.1 *Vznik a migrace PGCs*

PGCs jsou kmenové buňky, mající vysokou proliferační aktivitu. Prekursor gamet PGCs se nachází zpočátku v extragonadální oblasti embrya. U myši je tvorba PGCs závislá na expresi faktorů kostního morfogenetického proteinu 4 (BMP4, Bone Morphogenetic Protein 4) a kostního morfogenetického proteinu 8b (BMP8b, Bone Morphogenetic Protein 8b) (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000). Tyto faktory jsou produkovány extraembryonálním ektodermem.

Extraembryonální ektoderm působí díky expresi BMP4 a BMP8b jako induktor pro již kompetentní buňky epiblastu. U savců jsou PGCs diferencovány z buněk v posteriorní oblasti epiblastu v místě styku s extraembryonálním ektodermem, primitivním proužkem a *allantois*. Prvně detekovaná extraembryonální lokalizace PGCs u člověka je v dorzální stěně žloutkového váčku (endoderm) blízko vyvíjejícího se *allantois*. Ještě před samotnou gastrulací embrya dochází k přesunu prekurzorů PGCs do extraembryonální tkáně. Mezi 3. – 5. týdnem embryonálního vývoje u člověka dochází k migraci PGCs z oblasti středního střeva do zadního střeva embryonálního endodermu. Později okolo 5. týdne migrují PGCs skrz dorzální *mezenterium* do zárodečné rýhy. Při migraci PGCs do budoucích gonád dochází k jejich proliferaci. Během mitotického dělení PGCs dochází k rozsáhlým jaderným změnám, které jsou charakteristické aktivací genů pluripotence a epigenetickými modifikacemi zahrnujícími změny v DNA metylaci a histonového kódu.

3.1.1.2 Vstup oogonií do meiózy

Mitotická aktivita trvá u oogonií několik týdnů a překrývá se vstupem některých oogonií do meiózy. V 5. měsíci embryonálního vývoje lze detekovat mitoticky dělící se oogonie i primární oocyty v různých fázích meiózy (Baker, 1963). U ženy je meióza zahájena ve fetálním vaječníku během 11.-12. týdne věku plodu (Gondos et al., 1986). V profázi prvního meiotického dělení probíhá párování homologních chromozomů a dochází k rekombinaci. Okolo 5. měsíce embryonálního vývoje je počet oogonií a primordiálních folikulů značně zredukován v důsledku programované buněčné smrti. V období před porodem dochází u oocytů ke vstupu do prvního meiotického dělení, které je zastaveno ve fázi diplotene. Oocyty v tomto prvním meiotickém bloku setrvávají až do puberty, tedy u člověka několik let. Postnatální vývoj oocytů je po dosažení puberty charakterizován pokračováním folikulogeneze, dokončením prvního meiotického dělení a vstupem do druhého meiotického dělení. K úplnému dokončení meiotického dělení u savců dochází až po oplození oocyty spermií.

3.2 Folikulogeneze

Vývoj folikulů u člověka začíná již ve druhém trimestru fetálního období. U myši probíhá tvorba folikulu až v neonatálním období. Vývoj folikulu ovlivňují růstové faktory produkované

ovariálními somatickými buňkami a samotným oocytem. Somatická komponenta folikulu je tvořena z buněk granulózy, théky, endoteliálních buněk a podpůrné pojivové tkáně. Počet vzniklých folikulů závisí na rovnováze mezi časnou proliferací zárodečných buněk a jejich ztrátou v důsledku apoptózy. Dochází také k vzájemnému interagování mezi oocytem a okolními somatickými buňkami. Folikulogeneze vrcholí produkcí plně zralých, preovulačních folikulů. Folikulogeneze je řízena hormonální regulací, při které hrají roli gonadotropiny, folikuly stimulující hormon (FSH, Follicle Stimulating Hormone), luteinizační hormon (LH, Luteinizing Hormone), steroidy, cytokiny a dalšími faktory. Klíčovou událostí při folikulogenezi je získání schopnosti folikulů reagovat na stimulaci gonadotropiny syntézou dostatečného množství příslušných receptorů (shrnutí v Kishi et al., 2018).

3.2.1 Vznik folikulů

V průběhu několika dělení a ukončení migrace dochází u samic k diferenciaci PGCs do oogonií. Oogonie jsou primordiálními zárodečnými buňkami vaječníku. Během počáteční mitotické proliferace zárodečných buněk dochází v důsledku neúplné cytokineze k vytvoření zárodečných syncytií. U myši se tato syncytia rozpadají až po narození na jednotlivé oocyty, které jsou obklopeny pre-granulózními buňkami. Ztráta intracelulárních můstků mezi oocytem a okolními buňkami vede k vytvoření primordiálního folikulu. Udržení nebo rozpad syncytií je řízen maternálními hormony, například estrogenem (Jefferson et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Oocyty uložené v primordiálním folikulu označujeme jako primární oocyty.

3.2.2 Růstová fáze folikulu

Od období sexuální zralosti ženy až po vyčerpání ovariálních zásob dochází k pravidelnému rekrutování skupiny primordiálních folikulů a podpoře jejich vývoje pomocí gonadotropinů, FSH a LH. Toto období je označováno jako růstová fáze folikulu. Jen plně dorostlý folikul obsahuje meioticky kompetentní oocyt, který je schopen úspěšné maturace.

Skupina folikulů, jež je pravidelně rekrutována u člověka, je tvořena přibližně 15 až 20 primordiálními folikuly. Tyto folikuly prochází několika vývojovými stádii: nejprve je utvářen primární folikul, následně sekundární (pre-antrální) folikul a v poslední fázi terciální, také

antrální či preovulační folikul. Alternativně vznikají z rekrutované populace folikulů atretické folikuly, které fyziologicky předurčují folikuly k zániku.

Jakmile začíná primární oocyt růst, tak obklopující pre-granulózní ploché buňky začínají proliferovat a měnit se na kubické granulózní buňky. Výsledkem je primární folikul. U člověka lze pozorovat růst primárních folikulů kolem 24. týdne prenatálního vývoje. Růst primárního folikulu je regulován růstovými faktory přes autokrinní a parakrinní signalizaci. V období fáze růstu folikulu dochází v oocytu k produkci celé řady faktorů, nezbytných pro maturaci (meiotické zrání), oplození a časný embryonální vývoj. Oocyty získané z primárních folikulů, nejsou schopny obnovit meiózu. V průběhu růstu, folikulární buňky vysílají do *zona pellucida* výběžky s mezerovitými mezibuněčnými spoji (gap junctions), jenž jsou důležité pro transport materiálu z folikulárních buněk do oocytu.

Přechod mezi primárním a sekundárním folikulem je charakterizován vznikem *membrana granulosa* a diferenciací *theca folliculi*. Ukončení růstu folikulu je znakem pro znovuzahájení meiózy oocytu.

Další vývoj folikulu je charakterizován tvorbou dutiny naplněné tekutinou. Je označován jako antrální folikul. Růst antrálního folikulu je závislý na gonadotropinech. Vývoj plně vyvinutého sekundárního folikulu ze stádia primordiálního folikulu trvá u člověka přibližně 290 dnů. U antrálního folikulu jsou granulózní buňky strukturně a funkčně odlišeny. Kontakt mezi oocytem a kumulárními buňkami je stále zajištěn prostřednictvím gap junction. Regulace vedená přes *gap junction* udržuje oocyt v meiotickém bloku, dokud folikul nedosáhne stádia, kdy nastává ovulace.

Následně dochází k selekci dominantního folikulu. Ostatní rekrutované folikuly končí svůj vývoj atrezií. Oocyt v pre-ovulačním folikulu získává meiotickou a vývojovou kompetenci. LH vlna spouští meiotické zrání, dochází ke kondenzaci chromozomů, k oddělení homologních chromozomů, k extruzi pólového tělíska a následnému druhému meiotickému bloku. V tomto stádiu setrvává oocyt do oplození.

Během fáze růstu dochází k aktivní transkripci, k akumulaci buněčných organel, syntéze nových struktur, jakou je *zona pellucida*. Ukončení růstové fáze folikulu je druhově specifické. U myši je růstová fáze ukončena vytvořením časného antrálního folikulu (Erickson and Sorensen, 1974). Změny, které nastávají během vývoje folikulu jsou epigenetického i ne-epigenetického charakteru, vedoucí k vývojové kompetenci oocytu.

3.2.3 Metabolické změny během folikulogeneze

Primordiální a primární folikuly mají převážně metabolismus produkující NADH z glykolýzy nebo Krebsova cyklu (Cinco et al., 2016). V těchto folikulech je produkce NADH v oocytu zajištěna zvýšenou aktivitou Krebsova cyklu. Naopak v granulózních a interstiálních buňkách folikulů pochází produkce NADH převážně z glykolýzy. S přechodem primordiálního folikulu do primárního folikulu dochází k poklesu NADH v jádře oocytu. Tento pokles může být vysvětlen aktivitou SIRT1 a ADP-ribosyltransferáz. SIRT1 byl detekován v jádře oocytu u medulárně primordiálního, primárního a přechodného folikulu. Během přeměny primordiálního folikulu na primární folikul byla exprese SIRT1 v jádře oocytu nepřímo úměrná poklesu NADH. U primordiálního folikulu se objevuje vysoká hladina volného NADH, která inhibuje SIRT1 aktivitu. Během aktivace primordiálního folikulu dochází k poklesu NADH/NAD⁺ a tím k uvolnění inhibice a zvýšení jaderné aktivity SIRT1. Aktivita SIRT1 tak může vést k epigenetickým a ne-epigenetickým změnám, přispívající k vývojové kompetenci oocytu. V reakci na lidský choriový gonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin) dochází u preovulačního folikulu ke zvýšení hladiny NADH, blokující SIRT1 aktivitu.

3.3 Oogeneze v postnatálním životě

Samice většiny druhů savců vytvářejí pevný rezervoár zárodečných buněk v embryonálním vývoji, který je stálý a téměř neměnný. U člověka dochází k vyčerpání ovariální rezervy okolo páté dekády života. Vyčerpání ovariální rezervy je u žen spojeno s menopauzou. U některých primátů byly nalezeny stále proliferující zárodečné buňky (David et al., 1974). Není jasné, zda tyto buňky mohou přispívat ke zvětšování ovariálního rezervoáru v dospělosti a tím prodlužovat reprodukční schopnost samice.

V epitelu vaječníku myši byla detekovaná přítomnost kandidátních zárodečných buněk v různých stádiích mitózy. Tyto buňky nesou označení oogoniální kmenové buňky (Johnson et al., 2004). Johnson et al. také charakterizovali kinetiku klesajícího počtu folikulů v postnatálním životě myši a dospěli k závěru, že bez postnatální produkce folikulů by myši nedosáhly očekávané délky reprodukce. Přítomnost oktamer – vazebného transkripčního faktoru 4 (OCT4, Octamer – binding transcription factor 4) v buňkách izolovaných z myších neonatálních a

dospělých ovaríí dokazuje přítomnost kmenových buněk (Pacchiarotti et al., 2010). K dalšímu potvrzení přítomnosti kmenových buněk v ovariu, přispěla izolace samičí zárodečné linie kmenových buněk (FGCs, Femal Germ Cells) z neonatálního ovaria a ovaria dospělého jedince (Zou et al., 2009).

Ovariální zárodečná linie kmenových buněk pravděpodobně nehraje aktivní roli v oogenezi po narození, ale je rezervoárem, který může být za určitých podmínek aktivován (Pacchiarotti et al., 2010; Zou et al., 2009).

3.4 Regulace folikulogeneze

Počáteční fáze folikulogeneze je nezávislá na gonadotropinech, předpokládá se zahrnutí intra-ovariálních parakrinních faktorů. Rovněž oocyty hrají jedinečnou roli při tvorbě folikulu. S tvorbou antrálního folikulu je ukončena fáze růstu oocyty.

Základem reprodukčního života ženy je vývoj preovulačního Graafova folikulu. Tento vývoj je pod kontrolou FSH. Ve fyziologickém cyklu ženy odpověď na FSH stimul vede k dominanci pouze jedno folikulu.

3.4.1 Parakrinní signalizace

Mechanismy pro výběr, aktivaci primordiálních folikulů a samotný vývoj folikulů nejsou zcela jasné. Ovšem je zřejmé, že při vývoji folikulu hraje roli samotný oocyt. Oocyt ovlivňuje buňky murální granulózy produkcí parakrinních faktorů. Parakrinní faktory umožňují kumulárním buňkám podstoupit expanzi kumulu v odpovědi na LH stimul (Salustri et al., 1990). Expres parakrinních faktorů je dynamická během celého vývoje folikulu. Mezi hlavní skupinu polypeptidů ovlivňující folikulogenezi patří rodina transformující růstový faktor beta (TGF- β , Transforming Growth Factor – Beta).

3.4.1.1 *TGF-B*

Tato super rodina se účastní celé řady buněčných dějů zahrnujících proliferaci, diferenciaci, adhezi, motilitu i apoptózu buněk. K významným členům super rodiny TGF- β ovlivňující tvorbu a vývoj folikulu patří skupina proteinů označovaná jako kostní morfogenetické proteiny (BMP, Bone Morphogenetic protein). Tyto proteiny mají podobné funkce a často

působí synergicky. Například BMP6 a BMP15 společně inhibují produkci progesteronu. BMP15 také ovlivňuje produkci estradiolu (Otsuka et al., 2001). V granulózních buňkách se na modulaci proliferace a produkce steroidních hormonů podílí BMP-6 (Brankin et al., 2005). BMP6 společně s BMP4 ovlivňují luteinizaci, tedy přeměnu zralého folikulu ve žluté tělísko.

Přeměnu primordiálního folikulu na primární folikul ovlivňuje BMP-7, který stimuluje expresi FSH receptoru, a naopak snižuje expresi LH receptoru (Lee et al., 2004; Shi et al., 2010). K podpoře růstu sekundárního folikulu dochází ze strany BMP4. Zároveň některé faktory v přítomnosti FSH zvyšují expresi dalších parakrinních faktorů, příkladem je BMP4 zvyšující expresi BMP15 (Rossi et al., 2015). BMP-15 hraje roli v regulaci apoptózy kumulárních buněk a v stimulaci expanze kumulu prostřednictvím podpory exprese receptorů epidermálního růstového faktoru (EGF, Epidermal Growth Factor) (Otsuka et al., 2011). Mutace v genu pro BMP-15 mohou být příčinou neplodnosti.

Dalším významným členem TGF- β rodiny je activin A. Activin A reguluje proliferaci zárodečných buněk během vývoje a tvorby primordiálních folikulů (da Silva et al., 2004). V postnatálním ovariu vede activinová signální dráha k proliferaci granulózních buněk a podpoře tvorby antrálního folikulu. Delece genu pro activinový receptor II vede ke zvýšení počtu atretických folikulů a ke snížení počtu žlutých tělísek (Matzuk et al., 1995).

3.4.1.2 Růstové faktory EGF a IGF-1

Komunikace mezi murálními a kumulárními buňkami zprostředkovává signalizace založená především na růstových faktorech. K nejznámějším růstovým faktorům v kontextu folikulogeneze patří epidermální růstový faktor (EGF, Epidermal Growth Factor) a růstový faktor podobný inzulinu 1 (IGF-1, Insulin-Like Growth Factor-1).

EGF působí jako induktor ovulace, který je spojován s LH vlnou indukující společně s metalloproteinázami expresi EGF-podobných peptidů. Jsou to aphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) a betacellulin (BTC). Exprese těchto faktorů spouští kumulární expanzi a maturaci oocyty (Panigone et al., 2008; Park et al., 2004). Proteiny AREG a EREG podporují fosforylaci konnexinů vedoucí ke snížení toku cAMP a cGMP do oocyty. Narušení toku cAMP a cGMP v oocyty je spojováno s jaderným a cytoplazmatickým zráním (Downs et al., 1988). Samotná LH vlna způsobuje rychlou fosforylaci konnexinu 43, prostřednictvím MAP kinázové dráhy, aktivované přes EGF receptor (Norris et al., 2008; Norris et al., 2010). Aktivace signální dráhy závislé na EGF

receptoru navozuje rychlý pokles cGMP, v důsledku snižování hladiny mRNA pro natriuretic peptide precursor C (Nppc) (Liu et al., 2014). EGF signalizace kontroluje cytoplazmatickou maturaci oocyty, zahrnující regulaci translace mRNA ve zralém oocyty. EGF ovlivňuje kvalitu oocytů a získá vývojové kompetence oocyty (shrnutí v Richani and Gilchrist, 2018).

IGF-1 společně s FSH podporuje proliferaci a diferenciaci granulózních buněk (Zhao et al., 2001). Nedostatek IGF-1 vede k selhání ovulace (Baker et al., 1996). K hlavním rolím IGF-1 patří amplifikace signálu FSH ve folikulu. Také růst folikulu nebo atrézie folikulu mohou být závislé na syntéze a dostupnosti IGF-1 (Wandji et al., 1998). IGF-1 podporuje proliferaci a steroidogenezi buněk granulózy a podílí se na regulaci exprese FSH receptoru. Zvýšená koncentrace IGF-1 vede k aktivaci a vývoji vyššího počtu preantrálních folikulů, malých antrálních folikulů, rekrutování více vyvíjejících se folikulů a podílí se na vyšším počtu dominantních folikulů v rámci folikulární vlny (Silva et al., 2009).

3.4.1.3 GDF-9

GDF-9 je členem rodiny TGF β , který je produkovaný specificky savčím oocytem (McGrath et al., 1995). Delece GDF-9 vede k selhání organizace thekálních buněk, abnormálnímu růstu oocyty, snížení proliferace granulózních buněk a ke zvýšení diferenciace granulózních buněk (Dong et al., 1996; Vitt et al., 2000). V konečném důsledku vede delece GDF-9 k zastavení folikulogeneze ve fázi primárního folikulu. Naopak zvýšení bioreaktivity GDF-9, v důsledku vytvoření specifické mutace v GDF-9 a vytvoření tak chimerického GDF-9 M3, zvyšuje více jak dvojnásobně získá vývojově kompetentních oocytů (Li et al., 2015).

3.4.2 Další faktory hrající roli při folikulogenezi

Anti-Müllerian hormon, (AMH, Anti-Müllerian Hormone) je glykoprotein patřící do TGF- β rodiny, produkovaný vaječníky postnatálně (Durlinger et al., 1999). Je silně exprimován granulózními buňkami sekundárních, preantrálních a malých antrálních folikulů. AMH má inhibiční účinky na proliferaci buněk granulózy (Kim et al., 1992). AMH má inhibiční efekt na vývoj primordiálního folikulu na primární folikul (shrnutí v Dewailly et al., 2016). Dále inhibuje nábor folikulů závislý na FSH a zpomaluje růst folikulů. Koncentrace AMH v séru koreluje s počtem antrálních folikulů, proto AMH slouží jako marker plodnosti ženy.

Inhibin je produkován granulózními buňkami a na rozdíl od ostatních členů TGF- β rodiny má endokrinní efekt. Snižuje sekreci FSH produkovaného adenohypofýzou. V ovariu může inhibin působit jako antagonist aktivinu a regulovat tak syntézu androgenů (Findlay, 1993).

3.5 Maturace oocyty a získání vývojové kompetence

Oocyt musí projít celou řadou dějů zahrnující růst oocyty, konečnou diferenciaci a samotné meiotické obnovení. Období růstu oocyty začíná aktivací primordiálního folikulu. Produkce hypofyzárního gonadotropinu FSH stimuluje folikul k růstu. Aktivace primordiálního folikulu je ireverzibilní proces.

Preovulační folikul obsahuje plně dorostlý meioticky kompetentní oocyt, jenž je blokován ve fázi diktyotene prvního meiotického dělení. Kumulární buňky udržují oocyt v meiotickém bloku zprostředkovaným pomocí gap junction. Obnovení meiotického zrání oocyty je charakterizováno rozpadem zárodečného váčku (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown). Poté se oocyt dostává do metafáze II., kde nastává druhý meiotický blok.

Ke kritickým vývojovým změnám dochází během dokončení fáze růstu, kdy oocyt je ve stádiu zárodečného váčku (GV, Germinal Vesicle). Tyto změny mají vliv na výslednou vývojovou kompetenci oocyty. S tvorbou antrálního folikulu je ukončena fáze růstu oocyty. Oocyt v antrálním folikulu se stává meioticky kompetentní. Vývojově kompetentní oocyt je takový, který je schopný obnovit a dokončit meiotické dělení, dát vznik rýhujícímu se embryu, jenž později vytvoří blastocystu.

Získání vývojové kompetence je zaručen meiotickým, cytoplazmatickým a molekulárním zráním (Eppig et al., 1994).

3.5.1 Meiotická a cytoplazmatická kompetence oocyty

Během maturace oocyty dochází k jaderným změnám v GV oocyty. Jaderné události jsou indukované LH vlnou nebo arteficiálním odstraněním oocyty z prostředí folikulu vedoucí ke GVBD a k vyloučení prvního pólového tělíska. K vytvoření druhého pólového tělíska dochází až po oplození oocyty spermií u savců. Načasování meiotického zrání je přesné, definované a také snadno pozorovatelné.

První náznak cytoplazmatické kompetence nastává v okamžiku, kdy oocyt zastavuje přípravnou fázi, ve které probíhá syntéza RNA a s ní spojená translace. Dochází k jaderné kondenzaci a ztrátě ribozomů. Během prudkého zvýšení hladiny LH hormonu dochází k redistribuci buněčných organel, kortikálních granulí, snížení velikosti Golgiho aparátu a dalším buněčným změnám (Assey et al., 1994). Dalším aspektem této maturace je akumulace molekul, které připravují oocyt na oplození a následný embryonální vývoj. K vrcholu RNA syntézy u oocytu myši dochází před začátkem tvorby antra folikulu (Moore et al., 1974). Syntéza RNA dále probíhá v rostoucím oocyty myši i po GVBD (Rodman and Bachvarova, 1976). Během růstu oocytu je sestaven molekulární program vývoje a načasování transkripce mRNA pomocí MASKINŮ. Díky MASKINŮm dochází k načasování translace mRNA. Maskování a stabilita mRNA je řízená převážně zkracováním polyA konce, jenž je kontrolována regulačními sekvencemi v netranslantované oblasti mRNA.

Přes současnou úroveň poznatků dosud neexistují parametry pro přímé měření cytoplazmatické kompetence. Kvalitu cytoplazmatické kompetence oocytu lze zjistit zpětně zhodnocením časného embryonálního vývoje.

3.5.2 Morfologická kompetence oocytu

Hodnocení morfologické kompetence je nejrozšířenější neinvazivní způsob, kterým se selektují oocyty v asistované reprodukci. Takto vybrané oocyty jsou oplozovány technikami *in vitro* oplození. Kvalita oocytu je predikována na základě morfologických parametrů. Vývojová kompetence je závislá na velikosti folikulu (Pavlok et al., 1992). Nedostatečná velikost folikulu může být způsobená nedostatečnou syntézou RNA. To v konečném důsledku může znamenat nedostatek esenciálních proteinů potřebných pro oplození a časný embryonální vývoj. Morfologie kumulárního komplexu oocytu může predikovat schopnost oplození a vývojovou kompetenci oocytu (Ng et al., 1999). Morfologie kumulu se mění během preovulační periody, kdy dochází k disperzi a mucifikaci kumulární masy, tedy v období kumulární expanze. Abnormality, jakými jsou zvýšený počet granul nebo obsah vakuol v cytoplasmě oocytu, má negativní vliv na vývojový a implantační potenciál embrya. Nicméně některé morfologické odchylky jako tvar oocytu, nemusí mít vliv na implantační potenciál embrya a mohou být přirozenou heterogenitou oocytů (shrnutí v Balaban and Urman, 2006)

3.5.3 *In vitro* maturace

Savčí oocyty podléhají fyziologicky meiotickým blokům, které zabraňují předčasnému meiotickému zrání. První meiotický blok (fáze diplotene) může trvat i několik desítek let. Tyto nezralé oocyty čekají na stimul vedoucí k obnovení meiózy. Meiotické zrání oocyty je vyvoláno LH vlnou, která způsobí GVBD oocyty. Jakmile oocyt dokončí první meiotické dělení, tak ihned vstupuje do druhého meiotického dělení. V metafázi druhého meiotického dělení dochází k druhému meiotickému bloku. Dokončení meiózy je vyvoláno vstupem spermie do oocyty.

Zrání oocytů předurčuje vývojovou kompetenci oocytů a tím i kvalitu vzniklého embrya. Pro IVM jsou odebrány nezralé GV oocyty. Ty jsou přeneseny do kultivačního média, kde dochází k IVM. Maturované oocyty v podmínkách *in vitro* nedosahují kvality *in vivo* zralých (IVO, *in vivo* matured) oocytů. Proto je snaha zdokonalit techniky IVM oocytů a tím zvýšit úspěšnost ART. Kvalita IVM oocytů ovlivňuje embryonální vývoj, počet buněk tvořící embryo a apoptózu buněk. Omezený zisk oocytů s plnou vývojovou kompetencí patří k hlavním problémům IVM. Nicméně IVM je nadějná metoda pro ženy s polycystickými vaječníky a pro ženy podstupující onkologickou terapii. Další výhodou IVM je nízké riziko vzniku hyperstimulačního syndromu. V současnosti jsou v asistované reprodukci preferovány IVO zralé oocyty, které vykazují vyšší vývojovou kompetenci než IVM oocyty.

První náznak cytoplazmatické kompetence nastává v okamžiku, kdy oocyt zastavuje přípravnou fázi, ve které probíhá syntéza RNA a s ní spojená translace. Dochází k jaderné kondenzaci a ztrátě ribozomů. Během prudkého zvýšení hladiny LH hormonu dochází k redistribuci buněčných organel, kortikálních granulí, snížení velikosti Golgiho aparátu a dalším buněčným změnám (Assey et al., 1994). Nepravidelnost v distribuci kortikálních granul může mít vliv na zvýšené riziko vzniku polyspermie. Celkový počet mitochondrií a obsah ATP v oocyty může rozhodovat o vývojové kompetenci oocyty.

Dalším aspektem této maturace je akumulace molekul, které připravují oocyt na oplození a následný embryonální vývoj. K vrcholu RNA syntézy u oocyty myši dochází před začátkem tvorby antra folikulu (Moore et al., 1974). Syntéza RNA dále probíhá v rostoucím oocyty myši i po GVBD (Rodman and Bachvarova, 1976).

Přes současnou úroveň poznatků dosud neexistují parametry pro přímé měření cytoplazmatické kompetence. Kvalitu cytoplazmatické kompetice oocyty lze zjistit zpětně zhodnocením časného embryonálního vývoje.

3.6 Regulace meiózy

3.6.1 Kontrola hladiny cAMP

Regulace meiotického bloku je zajištěna pomocí cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Hladina cAMP v oocyty je ovlivňována produkcí cAMP v kumulárních buňkách. Toto cAMP je transportováno přes gap junction do oocyty. K syntéze cAMP dochází také uvnitř oocyty (Dekel and Beers, 1978; Mehlmann et al., 2002). Udržování hladiny cAMP v oocyty je řízeno receptorem zpraženým s G proteinem stimulující aktivitu adenylátcyklázy (Mehlmann et al., 2002). Uvolnění oocyty z folikulu vede ke spontánní maturaci oocyty v důsledku poklesu hladiny cAMP (Pincus and Enzmann, 1935). Hladina cAMP ovlivňuje rovnováhu mezi aktivním a inaktivním komplexem zvaným M-fázi/zrání podporující faktor (MPF). Vysoká hladina cAMP stimuluje protein kinázu A (PKA). Aktivní PKA inaktivuje fosforylací CDC25B fosfatázu. Dále PKA zprostředkovává aktivační fosforylací kináz WEE1B a MYT1. Tyto kinázy inhibují fosforylací CDK1.

Díky LH vlně dochází ke snížení hladiny cAMP. Nízká hladina cAMP vede k snížení aktivity PKA s efektem snížení inhibiční fosforylace CDC25B. Aktivní CDC25B fosfatáza defosforyluje komplex MPF. Samotná aktivace MPF vede k uvolnění prvního meiotického bloku.

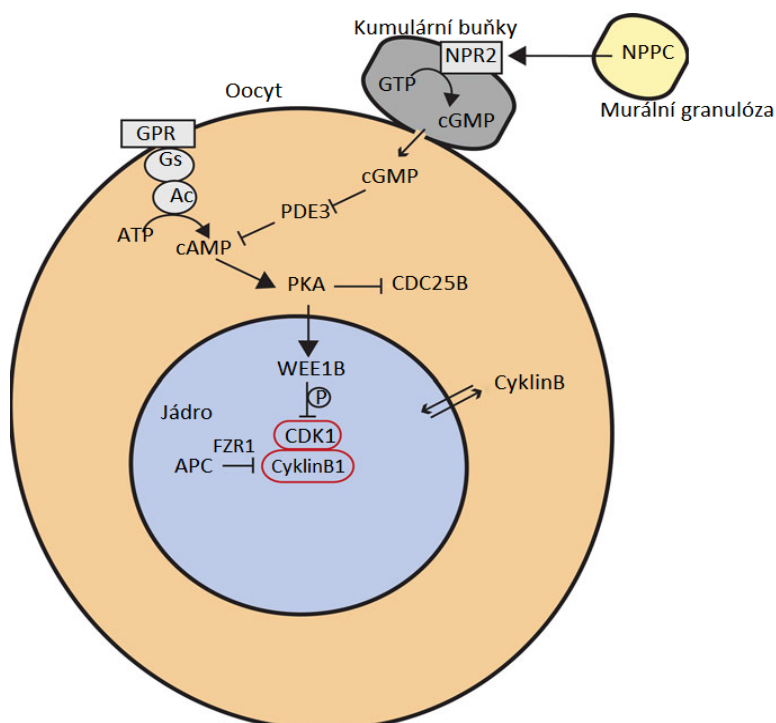
3.6.2 Kontrola hladiny cGMP

Hladina cAMP v oocyty je ovlivňována cyklickým guanosinmonofosfátem (cGMP). Hlavní rolí cGMP je inhibice aktivity fosfodiesterázy zodpovědné za snížení hladiny cAMP v oocyty (Degerman et al., 1997). Molekuly cGMP difundují z granulózních buněk do oocyty přes gap junction (Norris et al., 2009). Produkce cGMP je zajišťována kumulárními buňkami (Obr. 3.1), které jsou opatřeny membránově vázanou guanylcyklázou (Zhang et al., 2010).

3.6.3 MPF (M-phase/Maturation Promoting Factor)

MPF je heterodimer složený z cyklin – dependentní kinázy 1 (CDK1, Cyclin-Dependent Kinase 1) a regulační podjednotky cyklinu B. V regulaci meiózy hraje důležitou roli CDK1. Během prvního meiotického bloku je aktivita CDK1 udržována na nízké úrovni. Zvýšení aktivity CDK1 vede k uvolnění prvního meiotického bloku. Regulační podjednotkou CDK1 je cyklin B1. Během růstu oocyty dochází k zvyšování hladiny cyklinu B. K hlavním regulačním mechanismům regulující hladinu cyklinu B patří ubiquitinace. K další regulaci dochází na úrovni vazebné interakce cyklinu B a CDK1, kdy pro tuto vazbu je vyžadována fosforylace CDK1 v pozici threoninu 161. Pro úplnou aktivaci CDK1 je potřebná defosforylace na threoninu 14 a threoninu 15. Inhibiční fosforylace je zajišťována působením WEE1B a MYT kinázy, naopak aktivací defosforylace v těchto pozicích je zajištěna CDC25B (Cell Division Cycle 25B) fosfatázou (Han et al., 2005; Lincoln et al., 2002).

Savčí oocyty jsou před oplozením blokovány v metafázi druhého meiotického dělení (MII). Tento MII blok je udržován pomocí cytostatického faktoru. Cytostatický faktor zabraňuje ztrátě aktivity MPF. Oplozením dochází ke zvýšení hladiny Ca^{2+} , jenž vede k degradaci cyklinu, prostřednictvím anafáze podporujícího komplexu (APC, Anaphase-Promoting Complex). Inhibicí APC a cytostatického faktoru je pomocí aktivity MPF udržován druhý meiotický blok. Na regulaci meiotického bloku se podílí také protein EMI2, který je inhibítozem APC. K inhibici APC dochází přes c-MOS/MAPK signalizaci (shrnutí v Madgwick and Jones, 2007).



Obrázek 3.1 Signální dráha udržující oocyt v profázi I. meiotického dělení (převzato z Jones et al., 2013). Stimulovaná adenylát cykláza (AC) produkuje cAMP podporující aktivitu protein kinázy A. Guanylyl cykláza NPR2 (natriuretic peptide receptor 2) produkuje cGMP chránící pokles hladiny cAMP. Vysoká aktivita protein kinázy A (PKA) stimuluje aktivitu WEE1B kinázy zajišťující inhibiční fosforylaci CDK1 a inhibici CDC25B, která odstraňuje negativní fosforylaci z CDK1.

3.7 Epigenom oocyty

Jako epigenom označujeme celkový epigenetický stav buňky, který je dán epigenetickými modifikacemi DNA, histonů a nekódujících molekul RNA. Ke klíčovým mechanismům epigenetické regulace patří kovalentní modifikace DNA, jakou je DNA methylace. U savců se DNA metylace vyskytuje především v oblastech bohatých na cytosin a guanin, tedy v cytosin-fosfát-guanin ostrůvcích (CpG, Cytosin – phosphate – Guanine). DNA methylace je katalyzována enzymy označovanými jako DNA methyltransferázy (DNMTs, DNA methyltransferases). První třídou methyltransferáz jsou DNA methyltransferázy 1 (DNMT1), které jsou považovány za udržovací DNA methyltransferázy. DNMT1 methylují pouze hemimethylovanou DNA. Funkcí DNMT1 je udržení úrovně DNA methylace v buňce po DNA replikaci. Druhým typem methyltransferáz jsou DNA methyltransferázy 3 (DNMT3a a DNMT3b), fungující jako *de novo* methyltransferázy. Obě třídy methyltransferázy jsou schopné pomocí své domény

interagovat s histon deacetylázami (HDACs, histone deacetylases), což ve výsledku vede k umlčení genové exprese. DNA methylace může blokovat vazbu regulačních faktorů, nebo může vést k vazbě dalších vazebných partnerů, jenž potlačují transkripci. Navíc, DNA methylace může být zapojena do epigenetické regulace vedoucí k transgenerační dědičnosti. K rozsáhlým změnám v DNA methylaci dochází během vývoje zárodečných buněk a na počátku časného embryonálního vývoje.

K další epigenetickým modifikacím patří modifikace proteinových komplexů a struktur jakými jsou histony. Funkční jednotkou eukaryotického chromatinu je nukleosóm. Nukleosóm je složený z DNA o velikosti 146bp, která obtáčí oktamer histonů složený z histonů H3, H4, H2A a H2B. Dalším typem histonů je H1, který má především stabilizační funkci. Existují také sestřihové varianty histonů, které mohou zastupovat konkrétní histony. Histony hrají roli při sestavení chromatinu a regulaci genové exprese. Specifické modifikace histonů a proteinů vytváří histonový kód, který rozhoduje, zda daná oblast chromozomu bude nebo nebude transkribována. Mezi další epigenetické mechanismy patří RNA interference a modifikace, které ovlivňují kinetiku samotné replikace DNA. Epigenetické modifikace jsou spojené se získáním meiotické a vývojové kompetence oocytů.

3.7.1 Epigenetické změny v průběhu oogeneze

Vývojový program embrya je řízen genetickými a epigenetickými mechanismy. Během oogeneze dochází k epigenetickým i ne-epigenetickým změnám. Tyto změny souvisí se změnami v DNA methylaci, v konfiguraci chromatinu, v modifikacích histonů a dalších proteinových struktur. Chromatin zralého a oplození schopného oocyta nabývá podoby kondenzovaných chromozomů. Takto formovaný chromatin představuje soubor epigenetických změn, které odpovídají za stabilitu genomu a tím za vývojovou kompetenci oocyta.

3.7.1.1 *Methylace DNA a histonů během genového imprintingu*

Methylace DNA je chápána jako modifikace cytosinu, kdy na jeho uhlík v pozici 5 je přidána methylovaná -CH₃ skupina. V DNA dochází nejčastěji k methylacím v oblastech bohatých na cytosin. U proteinových struktur je methylace prováděna nejčastěji na lysinu nebo

argininu. Methylace histonů je post-translační modifikace. Methylová -CH₃ skupina se připojuje na koncový dusík aminokyseliny. Methylace nemusí znamenat pouze umlčení, ale také aktivní stav chromatinu v závislosti na kontextu. K významným procesům, kde DNA methylace hraje klíčovou roli patří genový imprinting a reprogramace genomu (změna methylačních vzorů).

Mechanismus genového imprintingu vede k transkripční aktivitě pouze jedné alely pocházející od otce nebo od matky. Utváření nového genového imprintingu probíhá v primordiálním folikulu až do stádia antrálního folikulu (Obata and Kono, 2002). To znamená, že primární imprinting genů probíhá po celou dobu růstu oocyty, nicméně v určitém časovém okně, které je specifické pro každý imprintovaný gen. Načasování genové imprintingu tak není náhodné, může se jednat o proces řízený epigenetickou pamětí, kdy rozhoduje maternální nebo paternální původ alel. Imprinting maternální alely nastává v časně fázi růstu oocyty, kdežto imprinting paternální alely byl detekován v pozdní růstové fázi oocyty antrálního folikulu (Lucifero et al., 2004). Pokud není připraven zralý folikul k ovulaci, tak nemusí být dokončen imprinting genů, methylace koreluje se zvyšujícím se průměrem oocyty (Lucifero et al., 2004). Po ustanovení imprintingu genů je tato informace uchována, až do vzniku PGCs v nově utvořeném embryu, kde opět dochází k vymazání předchozího a ustanovení nového imprintingu.

S migrací PGCs do zárodečné rýhy dochází ke globální demethylaci genomu a aktivaci inaktivovaného X chromozomu (Monk and McLaren, 1981). Ke snížení DNA methylace i H3K9 dochází v důsledku přechodné ztráty všech DNA metyltransferáz. Vstup primordiálního folikulu a oocyty do růstové fáze vede k zvýšení methylace genomu oocyty. Během folikulogeneze dochází ke zvyšování DNA methylace a acetylce histonů s pozdějším nárůstem methylace histonů.

Během růstu oocyty dochází k nárůstu H3K9me₂ a H3K9me₃ (Kageyama et al., 2007). S růstem oocyty se zvyšuje DNA metylace v CpG ostrůvcích (Smallwood et al., 2011). Methylační procesy jsou dokončeny v období, kdy oocyt vstupuje do prvního meiotického bloku. K další reprogramaci genomu v kontextu DNA methylace dochází krátce po oplození.

3.7.1.2 *Acetylace histonů ve zrajícím oocytu*

Acetylaci histonů regulují histon acetyltransferázy a histon deacetylázy (HDACs). K acetylacím dochází nejčastěji na lysinu, kdy na jeho ϵ -aminoskupinu je přidána acetylová skupina, která je přenesena z acetylkoenzymu A. Acetylace na lysinových zbytcích N terminálních konce histonů umožňuje přístup obecných transkripčním faktorům k DNA.

V GV oocytu je většina histonů na N-koncových lysinových koncích acetylována. Acetylace histonů ovlivňuje remodelaci chromatinu a načasování a počátek DNA replikace. Inhibice HDACs vede k acetylaci H3 a H4 v oblasti centromerického chromatinu. U kvasinek tato acetylace vede k defektní segregaci chromozomů (Ekwall et al., 1997). Zvýšení acetylace histonů během mitózy je spojené s nárůstem defektů v segregaci chromozomů (chromatin bridges a lagging chromosomes) (Cimini et al., 2003; Ekwall et al., 1997).

S růstem oocytu je spojena zvýšená acetylace histonů a methylace H3K4, umožňující změnu konfigurace chromatinu a zvýšení genové exprese. Změny struktury chromatinu se zdají být nepostradatelné pro správnou funkci centromer zajišťující přesnou segregaci chromozomů (De La Fuente et al., 2004)

Deacetylace histonů je spojována s kompaktací chromatinu a transkripční represí. K hypoacetylaci chromozomů dochází během mitózy. Snížení acetylace histonů H3 a H4 je charakteristické pro konstitutivně heterochromatinové oblasti v metafázních chromozomech. Rozsah deacetylace je závislý na vzdálenosti lysinů od N-konce histonů, kdy lysiny blízké N-konci jsou zcela deacetylovány, kdežto vzdálené lysiny jsou deacetylovány pouze částečně. U somatických buněk lysiny vzdálené od N-konce histonů hrají roli při kondenzaci chromozomů a separaci sesterských chromatid během mitózy. Při přenesení jádra izolovaného ze somatické buňky do ooplasmu oocytu v metafázi II, dochází k markantní deacetylaci histonů. Toto zjištění vytváří hypotézu, že v průběhu meiózy dochází k celkovému snížení acetylace genomu (Kim et al., 2003). Během GVBD je většina N-koncových lysinových zbytků histonů prominentně deacetylována. Deacetylace histonů se účastní zabránění replikace během GVBD (Vogelauer et al., 2002). Histon deacetyláza 1 (HDAC1, Histone Deacetylases 1) není kolokalizována s DNA v GV oocytu, ovšem během druhé fáze meiózy dochází ke kolokalizaci s DNA (Kim et al., 2003).

K deacetylaci histonů dochází v metafázi prvního a druhého meiotického dělení a k přechodné acetylaci během anafáze a telofáze prvního meiotického dělení (Endo et al., 2005).

3.7.1.3 *Konfigurace chromatinu v oocytu*

Nezralé GV oocyty vykazují dva typy chromatinové konfigurace, nazývané surrounded nucleolus (SN) a non-surrounded nucleolus (NSN). SN konfigurace je tvořena kondenzovaným chromatinem, který je kolem jadérka. NSN konfigurace je tvořena převážně difúzním chromatinem, který nevytváří heterochromatinový okraj kolem jadérka.

Chromatin GV oocyty je počátečně dekonduován (NSN) a během růstu oocyty se chromatin GV oocyty kondenzuje do SN konfigurace. GV oocyty s NSN konfigurací chromatinu jsou vývojově nekompetentní a vykazují nižší úroveň epigenetických modifikací ve srovnání s vývojově kompetentními oocyty s konfigurací SN typu (Kageyama et al., 2007). NSN konfiguraci má oocyt izolovaný z preantrálního folikulu, kdežto SN konfigurace je vlastní pro oocyt pocházející z antrálního folikulu (Debey et al., 1993). Transkripční aktivita je detekována v konfiguraci NSN chromatinu, přičemž je ovlivňována přítomností kumulárních buněk. Následně nabytá konfigurace SN koreluje s ukončením transkripce GV oocyty (De la Fuente and Eppig, 2001).

Na konfiguraci chromatinu a modifikaci histonů v GV oocyty má vliv také stárnutí organismu, které vede k neplodnosti (Manosalva and Gonzalez, 2010). U těchto oocytů byla detekována snížená hladina SIRT1.

3.8 Sirtuiny

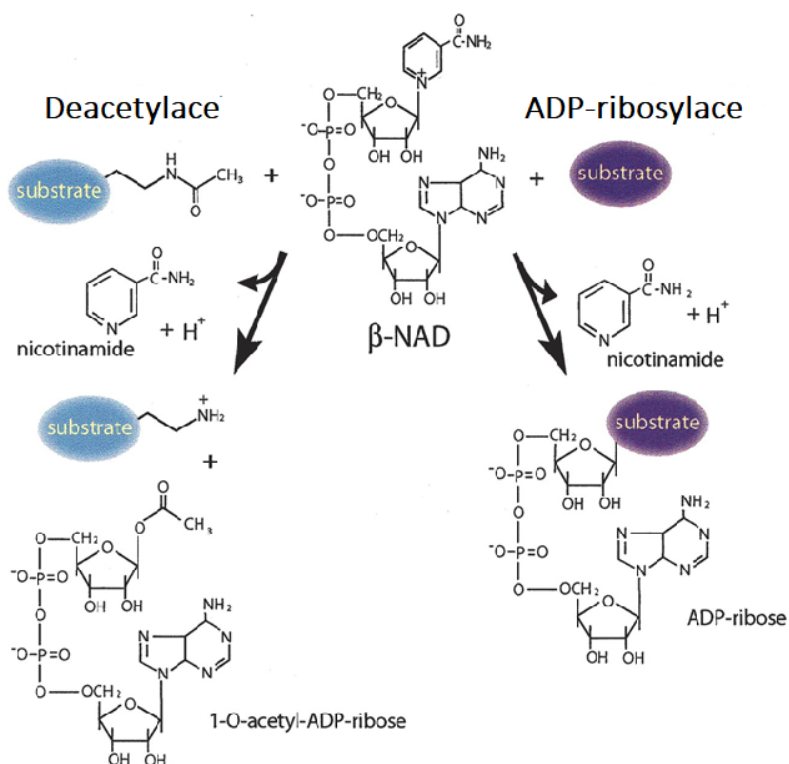
Rodina sirtuinů (SIR2) u savců se skládá ze 7 členů (SIRT1-7). Jedná se o NAD⁺-dependentní histon deacetylázy typu III. Sirtuiny byly objeveny jako metabolické a epigenetické regulátory, které se podílejí na homeostázi organismu. Uplatňují se v adaptačních mechanismech reagujících na změny v prostředí organismu. Jejich primární funkce je spojena s metabolismem a regulací chromatinu. SIR2 rodina je evolučně konzervována od bakterií až po člověka. Všichni členové této rodiny mají konzervovanou katalytickou doménu. Savčí sirtuiny mají různou buněčnou lokalizaci, která ovlivňuje jejich buněčnou funkci.

Nejvíce prostudovaným proteinem z rodiny SIR je kvasinkový SIR2. SIR2 má u kvasinky roli v transkripční regulaci, buněčném cyklu, meiózy, opravě DNA a stárnutí (Guarente, 1999). U

kvasinky je SIR2 spojen s prodloužením délky života (Kaeberlein et al., 1999). U kvasinky je popsána také role SIR2 během kalorické restrikce (Lin et al., 2000), která u mnoha organismů vede k prodloužení života. Lidským homologem kvasinkového SIR2 je SIRT1.

3.8.1 Reakční mechanismus

Sirtuiny působí v buňce jako deacetylační a ADP – ribosylační enzymy. Na rozdíl od jiných tříd HDACs, sirtuiny neuvolňují acetylovou skupinu ve formě acetátu. Namísto toho je acetylová skupina přenesena na ADP-ribózu, uvolňující O-acetyl-ADP-ribózu jako konečný produkt (Obr. 3.2) (Sauve et al., 2001). Bylo prokázáno, že metabolit O-acetyl-ADP-ribóza způsobuje zpoždění nebo zcela inhibuje dozrávání oocytů (GVBD) u hvězdice (Borra et al., 2002). Sirtuinová aktivita je ovlivňována pozitivně zvýšením dostupnosti NAD^+ a negativně zvýšením hladiny nikotinamidu. Druhým produktem deacetylační reakce je nikotinamid, který ve vztahu k sirtuinům se jeví jako nekompetitivní inhibitor (Bitterman et al., 2002). U sirtuinů je přítomná také mono ADP-ribosyltransferázová aktivita (Obr. 3.2) (Frye, 1999). ADP-ribosylační reakce hrají důležitou roli v mnoha fyziologických a patofyziologických procesech včetně buněčné signalizace.



Obrázek 3.2 Sirtuiny mají deacetylační a ADP – ribosylační aktivitu (převzato z Haigis and Guarente, 2006). U obou reakcí dochází ke štěpení NAD⁺ a uvolnění nikotinamidu.

3.9 SIRT1

SIRT1, také označován jako SIR2a, je u savců NAD⁺-dependentní deacetyláza, která je homologem kvasinkového SIR2 (SIR2a). SIRT1 je dominantně lokalizován v jádře buňky. SIRT1 je v mitóze kolokalizován na kondenzovaných chromozomech od prometafáze až do telofáze (Fatoba and Okorokov, 2011). SIRT1 ovlivňuje histonový kód především prostřednictvím deacetylace histonu H3K9 a H4K16. Dále deacetyluje celou řadu regulačních proteinů, čímž ovlivňuje apoptózu, buněčný růst, metabolismus, stárnutí a tumorigenezi.

Inhibice SIRT1 vede ke zvýšení populace buněk v G2/M fázi, zvýšení DNA poškození, nárůstu acetylace H3K9 a naopak ke snížení metylace H3K9 (Fatoba and Okorokov, 2011). Nedostatek SIRT1 je spojován s neúplnou kondenzací chromatinu a chybnou segregací chromozomů. To má za následek zvýšenou tvorbu chromozomových můstků, jenž jsou zdrojem aneuploidií v buňce. Většina nádorových buněčných linií mají snížené množství SIRT1 ve srovnání s netransformovanými buňkami.

Jak již bylo uvedeno výše, SIRT1 je dominantně lokalizován v jádře. Ovšem jeho výskyt může být zaznamenán také v cytoplazmě nebo zároveň v obou buněčných kompartmentech (Tanno et al., 2007). Lokalizace SIRT1 je řízená pomocí dvou jaderných signálních sekvencí a dvou exportních jaderných sekvencí, dále PI3K (Fosfatidylinositol-3-kináza) signální dráhou a sumoylací proteinu. Sumoylace SIRT1 vede k jaderné lokalizaci, naopak ne-sumylovaná forma SIRT1 je přítomná v buněčné cytoplazmě. Přítomnost SIRT1 byla detekována v oocytech, kumulárních a granulózních buňkách savců (Wang et al., 2014). V GV oocyty může docházet ke změně lokalizace SIRT1 v důsledku zvýšení oxidativního stresu (Di Emidio et al., 2014). To může vést k hypotéze, že lokalizace SIRT1 je proměnlivá.

3.9.1 Knock-out SIRT1 (SIR2a)

Deficit SIRT1 u buněk vede k akumulaci buněk v časně fázi mitózy a k narušení opravy DNA (Wang et al., 2008). U embryí SIRT1^{-/-} mutantních byly nalezeny aneuploidie chromozomů, strukturní aberace a změny v kondenzaci chromozomů.

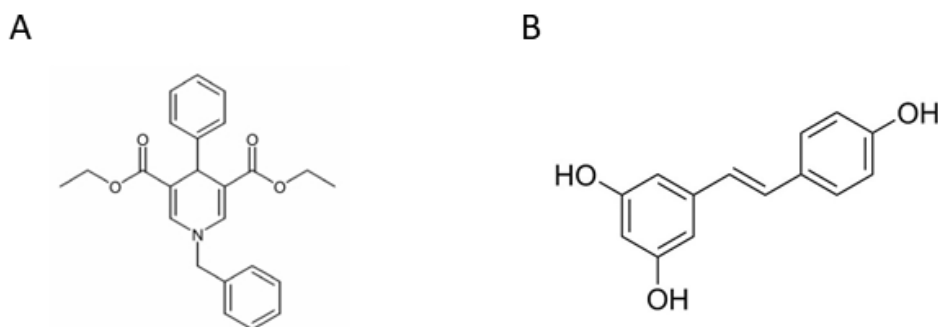
Knock-out SIRT1 vede převážně k embryonální letalitě v období E9.5.-E14.5. (McBurney et al., 2003; Wang et al., 2008). U těchto embryí jsou přítomny změny v modifikaci histonů a ve schopnosti opravit DNA. Dále SIRT1 knock-out naznačil, že SIRT1 není zapojen do globálního umlčování genů v savčím genomu. Jak již bylo uvedeno výše SIRT1 $-/-$ jedinci mají prokazatelně vyšší embryonální a postnatální úmrtnost než wild-type (McBurney et al., 2003). Přeživší SIRT1 $-/-$ jedinci jsou po narození menšího vzrůstu v porovnání s wild-type nebo heterozygotem. Postnatální vývoj SIRT1 $-/-$ myši je závislý na jejich genetickém pozadí. Myši s outbredním genetickým pozadím se mohou dožít dospělosti, nicméně s pohlavní sterilitou.

3.9.2 Inhibitory a aktivátory SIRT1

Inhibitory histon deacetyláz jsou klasifikovány jako protinádorové drogy. Inhibitory můžeme rozdělit do dvou skupiny na specifické a nespecifické inhibitory SIRT1. Mezi nespecifické inhibitory SIRT1 patří splitomicin. Transkripční profil buněk ovlivněných splitomicinem je u *Saccharomyces cerevisiae* podobný SIR2 delecí (Bedalov et al., 2001). Dalším nespecifickým inhibitorem SIRT1 je samotný produkt deacetylázové reakce, nikotinamid. Nikotinamid působí jako nekompetitivní inhibitor SIR2 proteinům (Bitterman et al., 2002). Mezi nespecifické inhibitory histon deacetyláz patří také trichostatin A (TSA). TSA umožňuje zvýšit úspěšnost klonovacích technik (Kishigami et al., 2006). Nicméně TSA působí negativně na interakci mikrotubulů a kinetochor, dále aktivuje mitotický kontrolní bod vedoucí k zastavení buněčného cyklu (Cimini et al., 2003). K další regulaci dochází pomocí dostupnosti kofaktoru NAD⁺, který je určitou formou regulace pro celou SIR2 rodinu proteinů.

Mezi aktivátory SIRT1 patří quercetin a piceatannol, které jsou izolované z rostlin (Howitz et al., 2003). Oba dva aktivátory jsou identifikovány jako inhibitory protein kináz. Mezi účinné ovšem nespecifické aktivátory patří polyfenolická molekula resveratrolu. Resveratrol aktivuje SIRT1 jako alosterický efektor, který se podílí na urychlení nástupu jeho aktivity (Borra et al., 2005; Howitz et al., 2003). Resveratrol patří mezi nejvíce používané aktivátory SIRT1 i přes jeho nespecifičnost. SIRT1 je regulován resveratrolem i v úrovni mRNA exprese (Costa Cdos et al., 2011). K dalším významným aktivátorům SIRT1 patří skupina malých molekul aktivujících SIRT1 například SRT1720, STR501 (Milne et al., 2007; Smith et al., 2009). Ukazuje se, že vliv aktivátorů SRT1720, SRT2183, SRT1460, resveratrolu na SIRT1 nemusí být přímý (Pacholec et

al., 2010). Resveratrol nepřímo aktivuje SIRT1 prostřednictvím dráhy cAMP-Epac1-AMPK-SIRT1 (Park et al., 2012). K dalším aktivátorům SIRT1 patří BML-278 (N-Benzyl-3,5-dicarbethoxy-4-phenyl-1,4-dihydropyridine). Jedná se o syntetickou látku, se schopností zvýšit specificky enzymatickou aktivitu SIRT1 (Mai et al., 2009).



Obrázek 3.3 Chemický vzorec BML-278 (A) a resveratrolu (B). Obě dvě molekuly jsou strukturálně odlišné.

3.9.3 Vliv resveratrolu na kvalitu oocytů

Omezení kalorií v podobě mírné kalorické restrikce v dospělém životě může vést k prodloužení reprodukce (Selesniemi et al., 2008). Což může být vysvětleno zvýšením aktivity SIRT1 během kalorické restrikce. Samotný SIRT1 může inhibovat aktivaci primordiálních folikulů a folikulární atrezii (Zhou et al., 2014). Resveratrol má vliv na zisk kvalitních oocytů s charakterem kompaktního vřetena se zarovnanými chromozomy (Liu et al., 2013). U starších myší ovlivněných resveratrolem byl nalezen vyšší počet oocytů než u stejně staré kontrolní skupiny.

Užití resveratrolu během IVM bovinních oocytů mělo pozitivní vliv na úspěšnost IVM, oplození a tvorbu blastocyt (Wang et al., 2014). Resveratrol pravděpodobně působí jako fytoestrogen, vykazující kompetitivní vazbu na receptory estrogenu vedoucí ke snížení sekrece estrogenu. Zvýšená hladina progesteronu inhibuje adenylát cyklátu a aktivuje Map kinázovou kaskádu MOS/MEK1/p42, která vede k aktivaci Cdc2/cyklinB a ke GVBD oocytu (shrnuje Wang et al., 2014). Dále podporuje expanzi kumulu a vyloučení pólového tělíska po maturaci. K dalším benefitům užití resveratrolu během IVM bylo zvýšení exprese antioxidantních genů v oocytu.

Účinek resveratrolu na reprodukci byl sledován také u myší (Liu et al., 2013). Podávání resveratrolu u myší vedlo ke zvýšení počtu primordiálních, primárních folikulů, rostoucích a zralých folikulů. Opačný vliv měl resveratrol na počet folikulů v atrezii, které snižoval. Pozitivní účinek resveratrolu se projevoval zvýšením počtu a kvalitou oocytů (Liu et al., 2013).

Měřením relativní délky telomer u buněk ovária vede k hypotéze, že resveratrol zabraňuje zkracování telomer a zvyšuje aktivitu telomerázy. Telomeráza je aktivní pouze v některých typech buněk, jakými jsou nádorové, kmenové a samčí zárodečné buňky. Délka telomer může být použita jako jeden z parametrů určující vývojový potenciál oocyty, jejich délka predikuje úspěšnost IVF a těhotenství (Kalmbach et al., 2015; Keefe et al., 2006). Resveratrol zvyšuje expresi SIRT1 a mění expresi genů ovlivňující apoptózu a stárnutí.

3.9.4 Cíle SIRT1 signalizace

Cíle SIRT1 signalizace jsou epigenetického i ne-epigenetického charakteru, vedoucí k buněčné regulaci. Epigenetické cíle SIRT1 míří především na modifikace histonů. Nicméně signalizace SIRT1 nemusí cílit pouze na histony, ale také na přímé ovlivnění nejrozličnějších buněčných procesů. Navíc SIRT1 ovlivňuje celou řadu proteinů, které rozvírají potenciální pole působení SIRT1 v buňce. K regulaci SIRT1 může docházet také přes RNA interferenci a naopak SIRT1 může působit jako faktor regulující expresi miRNA (převzato z Yamakuchi, 2012).

3.9.4.1 *p53 a apoptóza buněk*

Protein p53 patří do skupiny proteinů podílejících se na buněčné apoptóze. Posttranslační modifikace p53 vedou k regulaci jeho aktivity. SIRT1 specificky deacetyluje K382 na p53. Nepřítomnost SIRT1 vede k hyperacetylaci p53. Acetylace p53 zvyšuje jeho aktivitu (Gu and Roeder, 1997). Funkční důsledek deacetylace p53 je zeslabení proteinové aktivity jakožto transkripčního faktoru v promotoru p21WAF1 (Vaziri et al., 2001). SIRT1 inhibuje aktivitu p53 prostřednictvím přímé interakce, která vede k zeslabení transkripční aktivity samotného p53 (Ford et al., 2005; Luo et al., 2001). K ovlivnění apoptózy buněk nádorové linie HCT116 dochází, přes kaspázy 3 a 7, které SIRT1 aktivně potlačuje (Ford et al., 2005). Inhibice SIRT1 v nádorových buňkách vede k zastavení buněčného růstu, k akumulaci buněk v G1 fázi a k apoptóze. U

nenádorové buněčné linie inhibice SIRT1 nemá vliv na apoptózu ani na buněčný růst (Ford et al., 2005). To naznačuje rozdílnou funkci SIRT1 v nádorových a nenádorových buňkách.

Protein Ku70 je především jaderný protein účastnící se DNA opravy. Lokalizace Ku70 v cytoplasmě souvisí s regulací apoptózy prostřednictvím sekvestrace proapoptotického proteinu Bax. SIRT1 se váže na KU70, tato vazba vede k celkovému snížení acetylace Ku70 a to i na C-konci v pozici K539 a K542, které hrají roli během regulace Bax proteinu. Deacetylase K539 a K542 prostřednictvím SIRT1 vede k potlačení apoptózy zprostředkovanou Bax proteinem (Cohen et al., 2004).

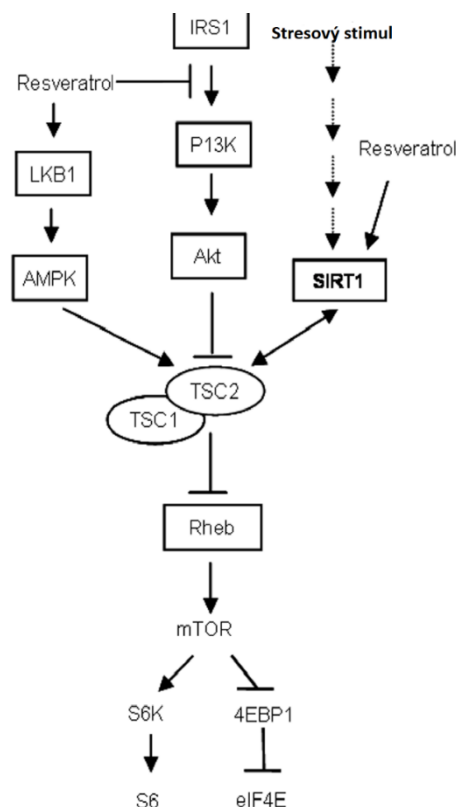
SIRT1 se podílí na udržení vyšší citlivosti kontrolního bodu G1/S a jeho role může být také v zajištění odpovědi buňky na DNA poškození (Wang et al., 2008). SIRT1-/- mutantní buňky mají sníženou tvorbu počáteční fosforylace γ H2AX. Kdy γ H2AX je označován jako senzor DNA poškození. Aberantní snížení hladiny γ H2AX vede ke snížení efektivního rekrutování potřebných proteinů RAD1, BRCA1, NBS-1 do místa poškození, jenž ve výsledku vede k nedostatečné odpovědi buňky na DNA poškození. Účast SIRT1 v odpovědi buňky na DNA poškození není závislá na ATM/CHK2/p53 signální dráze (Wang et al., 2008).

3.9.4.2 *mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin)*

mTOR signální dráha reguluje proliferaci buněk v závislosti na růstových faktorech a stresových podmínkách. Deplece SIRT1 v nádorových buňkách vedla k zvýšení signalizace mTOR signální dráhy, bez ohledu na stresové podmínky (Ghosh et al., 2010). Dále knock-out SIRT1 u myší potvrdil zvýšenou aktivitu mTOR signální dráhy. Resveratrol vede k potlačení mTOR signalizace nezávisle i v závislosti na SIRT1. To je způsobeno nespecifickým působením resveratrolu. SIRT1 se podílí na regulaci upstream faktorů mTOR signální dráhy. SIRT1 interaguje s TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), který je součástí mTOR-inhibujícího komplexu (Ghosh et al., 2010).

U myších oocytů delece Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) a TSC2 vede k nadměrné aktivaci primordiálních folikulů prostřednictvím mTOR signální dráhy, což má za následek předčasné ovariální selhání (Adhikari et al., 2010). Nádorový supresor TSC u myších oocytů potlačuje folikulární aktivaci. Toto zjištění podporuje myšlenku, že aktivace primordiálních folikulů závisí na fungování mTOR signalizace.

Zainhibování mTOR signální dráhy inhibitorem rapamycinem vedlo k potlačení vývoje folikulů a ke dvojnásobnému zvýšení folikulární rezervy se zvýšením exprese SIRT1 a SIRT6 v ovariu dospělých potkanů (Zhang et al., 2013). Ke zvětšení folikulárního rezervoáru může dojít přes sníženou aktivaci primordiální folikulů, zpomalením meiotického zrání nebo zpomalením atrézie folikulů.



Obrázek 3.4 Schematické znázornění aktivace SIRT1 regulující mTOR signalizaci přes komplex TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) a TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) (převzato z Ghosh et al., 2010). SIRT1 se podílí na downregulaci mTOR signální dráhy v reakci na stresové stimuly.

3.9.4.3 *FoxO*

Jedná se o rodinu proteinů fungující jako senzory insulinové signální dráhy, jejichž funkcí je regulovat dlouhověkost organismu, detoxikaci reaktivních kyslíkových forem, opravu DNA, apoptózu, regulaci buněčného cyklu v kontrolních bodech (Brunet et al., 2004; Kops et al., 2002; Tran et al., 2002). Dále protein FoxO1 (Forkhead-rabdomyosarcomat-transcription factor1) se podílí na remodelaci chromatinu (Hatta and Cirillo, 2007). Acetylace transkripčních proteinů vede většinou ke zvýšení vazebné schopnosti k DNA. Nicméně u faktoru FoxO1 acetylace slouží

jako inhibiční modifikace. Nadměrná exprese SIRT1v savčích buňkách snižuje hladinu acetylace u FoxO1. Acetylace FoxO1 je zprostředkována pomocí CBP (cAMP-Response Element-Binding-Protein-Binding-Protein). Acetylace pomocí CBP je reverzibilní a je odstraňována SIR2 (Daitoku et al., 2004). SIR2 zvyšuje transkripci zprostředkovanou FoxO1 v závislosti na deacetylaci. To naznačuje, že SIRT1, který je homologem SIR2 u člověka, slouží jako transkripční tlumič genů pro insulin-signální dráhu a především jako transkripční koaktivátor FoxO1, jenž naopak zvyšuje expresi antioxidační genu.

SIRT1 a FoxO3 (Forkhead-Rabdomyosarcomat-Transcription Factor 3) vytvářejí komplex odpovídající na oxidativní stres v buňce. SIRT1 zvyšuje schopnost FoxO3 vyvolávat zástavu buněčného cyklu a zvyšovat odolnost vůči oxidativnímu stresu. Zároveň SIRT1 zabraňuje FoxO3 indukovat buněčnou smrt. SIRT1 ovlivňuje negativně aktivitu FoxO3, FoxO1 a také FoxO4 (Forkhead-Rabdomyosarcomat-Transcription Factor 4) (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004). Deacetylace FoxO4 prostřednictvím SIRT1 vede k prodloužení transkripce genů regulující stres v důsledku aktivního FoxO4 (van der Horst et al., 2004). Tento mechanismus může přispívat ke zvýšení odolnosti buněk vůči stresu.

3.9.4.4 *SUV39H1a MDM2*

SIRT1 a SUV39H1 (Suppressor of Variegation 3-9 Homologue 1) patří mezi enzymy spojované s tvorbou fakultativního heterochromatinu. SIRT1 může být také zapojen do udržování konstitutivního heterochromatinu v důsledku regulace SUV39H1 (Bosch-Presegue et al., 2011). SUV39H1 je histon methyltransferáza podílející se na akumulaci H3K9me3 v heterochromatinové oblasti. Methylace H3K9 usnadňuje tvorbu heterochromatinu díky náboru heterochromatinového proteinu 1 (HP1, Heterochromatin protein1), který interaguje s dalšími faktory (SUV39H1) za účelem vytvoření kompaktní struktury bez transkripční aktivity (Stewart et al., 2005). Methylace H3K9 je schopná zabránit acetylaci H3, indukovanou přes p300 acetyltransferázu (Wang et al., 2001). Zvýšená hladina rekombinantního SIRT1 zvyšuje hladinu methylace H3, zprostředkovanou SUV39H1. Inhibice aktivity SIRT1 pomocí nikotinamidu snižuje aktivitu SUV39H1 *in vivo* (Vaquero et al., 2007). Mutace SIRT1-/- negativně ovlivňuje SUV39H1 methylaci histonu H3K9 v heterochromatinových oblastech a vede k narušení lokalizace HP1 (El Ramy et al., 2009; Vaquero et al., 2007). Acetylace Lys266 mění inter-doménovou interakci, podílející se na enzymatické aktivitě SUV39H1. To vede ke snížení aktivity enzymu. Acetylace

v pozici Lys266 na SUV39H je odstraněna SIRT1. K regulaci SIRT1 dochází také v důsledku vazebné interakce SUV39H1 s HP1 γ na promotor genu *Sirt1*. Společně vytváří H3K9me3, vedoucí k trans-represi SIRT1 (Yang et al., 2017).

SIRT1 společně s dalšími interakčními partnery se podílí na udržení pericentrických heterochromatinových struktur, které jsou důležité pro zachování jaderné integrity a segregace chromozomů. Navíc pericentrický chromatin umožňuje vyšší motilitu a rychlejší výměnu SUV39H1 v prostředí. Dále vazba HP1 na pericentromery je esenciální pro udržení integrity kinetochor a udržení správného průběhu mitózy.

Nadměrná exprese SIRT1 prodlužuje poločas rozpadu SUV39H1 (Bosch-Presegue et al., 2011). SIRT1 stabilizuje SUV39H1 interakcí s jeho chromodoménou, kde zabrání polyubiquitinaci Lys87 přes inhibici Mouse Double Minute 2 (MDM2) (Bosch-Presegue et al., 2011). MDM2 je ubiquitin ligáza E3, regulující proteazomální degradaci p53. Zvýšení exprese MDM2 podporuje metylaci H3K9 v promotoru p21. Knock-out MDM2 je embryonálně letální.

H3K9me3 hraje roli během vytváření heterochromatinových domén. Na tyto domény nasedají další proteiny účastníci se umlčení chromatinu. MDM2 specificky interaguje se SUV39H1 a EHMT1 (Chen et al., 2010). EHMT1 funguje v heterodimerovém komplexu s histon methyltransferázou G9a zajišťující metylaci H3K9 v euchromatinové oblasti (Tachibana et al., 2005). Na regulaci MDM2 prostřednictvím acetylace/deacetylace Lys zbytků 182 a 185 se podílí acetyláza p300 a SIRT1 (Nihira et al., 2017). Acetylace Lys 182 ovlivňuje konformaci MDM2, zvyšující přístupnost domény RING. Vyšší přístupnost domény vede k interakci s p53, následně k jeho ubiquitinaci vedoucí k jeho degradaci. Interakce MDM2 a SIRT1 umožňuje jeho vlastní ubiquitinaci a degradaci MDM2.

3.9.4.5 *Deacetylace a acetylace mikrotubulů*

Mikrotubuly hrají roli v udržení tvaru buňky, buněčného transportu, buněčného dělení a dalších důležitých buněčných procesech. V průběhu meiotické maturace oocyty dochází k formování dělicího vřeténka. Plně formované vřeténko migruje k periférii oocyty, kde dochází k vydělení pólového tělíska.

Post-translační modifikace jsou důležité mechanismy pro kontrolu dynamiky mikrotubulů. Tyto modifikace hrají roli také v kontrole mikrotubulárního transportu, který probíhá prostřednictvím molekulárních motorů.

Acetylace tubulinu je reverzní modifikace, kdy za účasti deacetylačních enzymů může docházet k deacetylaci tubulinu. Existují náznaky, že deacetylační proteiny tubulinu jsou v jednom komplexu multiproteinů, který ovlivňuje dynamiku mikrotubulů (North et al., 2003; Zilberman et al., 2009). Acetylace tubulinu je spojována se stabilizací vřeténka a probíhá většinou po sestavení mikrotubulů. Acetylace tubulinu u myších oocytů a embryí je časově a prostorově variabilní (Schatten et al., 1988).

U neoplozeného oocyty je lokalizace acetylovaného alfa-tubulinu lokalizována převážně na pólech metafázového meiotického vřetena. Během meiotické anafázy dochází ke zvyšování signálu acetylace tubulinu dělicího vřeténka. Ztráta acetylovaného zbytku na α -tubulinu (Lys40) vede k ovlivnění vazby motorické domény kinezinu-1 v *in vitro* podmínkách (Reed et al., 2006). K deacetylaci tubulinu může docházet i prostřednictvím HDAC typu III, například SIRT2 (North et al., 2003).

Meiotické zrání oocytů je spojeno se získáním vývojové kompetence, předurčující osud oocyty. V průběhu zrání dochází k řadě epigenetických a ne-epigenetických regulací, které jsou spojeny s vývojovou kompetencí oocyty. V posledních letech roste počet publikací, které zdůrazňují roli epigenetiky v embryonálním vývoji, ve vývoji onemocnění a také ve stárnutí organismu. Během embryogeneze a oogeneze dochází k důležitým epigenetickým regulacím (genový imprinting, změna methylačních vzorců, inaktivace X a další). Samotný růst a zrání oocyty předurčuje vznik a vývoj nového jedince. Ani v dnešní době, *in vitro* meiotické zrání lidských oocytů nepřináší uspokojivé výsledky z pohledu získání plně vývojově kompetentních oocytů. Přestože, existují optimalizované protokoly pro získání *in vivo* zralých oocytů, tyto protokoly nejsou vhodné pro všechny pacienty. Proto je potřeba více optimalizovat protokol meiotického zrání oocytů v podmínkách *in vitro*.

SIRT1 představuje protein, jehož aktivita skýtá významný potenciál. Jeho cílové substráty jsou epigenetického i ne-epigenetického charakteru. Proto modulace aktivity SIRT1 v oocytech může představovat nástroj pro zlepšení kvality oocytů. Naší hypotézou je, že SIRT1 působí během meiotického zrání oocytů jako signální molekula, která vede k epigenetické i k ne-epigenetické regulaci.

4 Cíle práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že SIRT1 působí během meiotického zrání oocyty jako signální molekula, která vede k epigenetické i ne-epigenetické regulaci. Tyto výsledky přispějí k širšímu porozumění a zvýšení úspěšnosti *in vitro* maturace oocytů. Za tímto účelem byly stanoveny následující dílčí cíle:

- Lokalizovat SIRT1 v nezralém a zralém oocyty a případně provést ko-lokalizační analýzu s danou buněčnou strukturou
- Provést detekci SIRT1 exprese v nezralých, *in vivo* zralých, *in vitro* zralých oocytech a v ovariální tkáni myši.
- Porovnat aktivační schopnost obecného aktivátoru sirtuinů resveratrolu a specifického aktivátoru BML-278
- Provést *in vitro* maturaci myších oocytů s aktivátorem BML-278 a zjistit zisk zralých oocytů po ovlivnění tímto specifickým aktivátorem
- Provést imunocytochemické barvení a vyhodnocení pro potenciální histonové i nehistonové cíle SIRT1
- Provést TUNEL assay a vyhodnotit vliv SIRT1 na DNA fragmentaci oocytů
- Objasnit dynamiku působení SIRT1 během meiotické maturace oocytů

5 Materiál a metody

Název chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
4'6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI)	Vector Laboratories Inc	H-1200
Anti-acetylovaný α tubulin	Abcam	ab24610
Anti-H3K4me2	Abcam	ab7766
Anti-H3K9me2/3	Abcam	ab184677
Anti-rabbit AlexaFluor 488	Thermo Fisher Scientific	
Anti-rabbit AlexaFluor 647	Thermo Fisher Scientific	
Anti-SIRT1	Abcam	ab1048333
Anti-ubiquitin (K119) H2A	Cell Signaling technology®	D27C4

Anti- α tubulin	Cell Signaling Technology®	2144
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Switzerland	1183615300
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma – Aldrich®	M81802
ECL Select Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	RPN2235
Falloidin	Cell Signaling technology®	13054
In Situ Cell eath Detection Kit	Roche, Mannheim, Germany	11684795910
Isobutyl-methylxanthine (IBMX)	Sigma – Aldrich®	I5879
M16 medium	Sigma – Aldrich®	M7292
M2 medium	Sigma – Aldrich®	M7167
Myší monoklonální anti-SIRT1	Abcam	ab104833
Myší monoklonální anti- β -aktin	Santa-Cruz Biotechnology	Sc-47778
Olej minerální	Sigma – Aldrich®	330779
Olej parafinový	Sigma – Aldrich®	18512
Paraformaldehyd	Sigma – Aldrich®	P6148
PBS	Sigma – Aldrich®	P5368
Polyvinyl-alcohol (PVA)	Sigma – Aldrich®	341584
SDS	Sigma – Aldrich®	1614363
Triton X-100	Sigma – Aldrich®	93443
Tween 20	Sigma – Aldrich®	P1379

Chemikálie byly zakoupeny od Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. V naší studii byl použit specifický aktivátor SIRT1 BML-278 (Abcam; Cambridge, UK, s katalogovým číslem ab144536). Aktivita BML 278 byla porovnávána s nespecifickým aktivátorem SIRT1 resveratrolem (Abcam; ab20726) v testu fluorometric SIRT1 Activity Assay Kit (Abcam; ab156065).

5.1 Modelový organismus

Všechny pokusy, které byly prováděny na zvířatech jsou v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týraní. Jako modelový organismus byla zvolena Myš domácí (*Mus musculus*). Samice myši CD1 staré 6 – 8 týdnů byly chovány během testování v podmínkách s fotoperiodou 12L:12D, teplotou 21 \pm 1 °C, vlhkostí dosahující 60 % a volnou

dostupností k potravě a vodě. Izolace GV oocytů byla prováděna po 48 hod. po intraperitoneální aplikaci 5 IU PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin). Pro získání *in vivo* zralých oocytů byla myším intraperitoneálně podána dávka PMSG a 5 IU hCG. Izolace kumulus–oocytárních komplexů z vejcovodů byla provedena 16 hod. po aplikaci hCG.

5.2 Metody

5.2.1 *In vitro* maturace

Samice myši byly usmrčeny cervikální dislokací. Po izolaci ovarií byla provedena izolace samotných GV oocytů v manipulačním médiu M2 s přidavkem inhibitoru zrání 100 μ M isobutyl–methylxanthine (IBMX). Plně dorostlé GV oocyty bez kumulárních buněk s intaktní ooplazmou byly ponechány 1 h v kultivačním médiu M16 s přidavkem 100 μ M IBMX. Poté byla provedena 16 hod. *in vitro* maturace v kultivačním médiu M16, 37 °C a 5 % koncentraci CO₂. Během *in vitro* maturace byl použit SIRT1 specifický aktivátor BML-278 v konečných koncentracích 0,125, 0,25 a 0,5 μ M v M16 médiu. Za účelem sledování závislosti aktivity SIRT1 na GV chromatin byly GV oocyty kultivovány 16hod. v M16 médiu s přidavkem IBMX a BML-278. BML-278 byl ve všech experimentech ředěn dimethylsulfoxidem (DMSO), který nepřesáhl výslednou koncentraci 0,1 % (v/v) v M16 médiu. DMSO bylo přidáno také do kontrolních skupin (vehicle control) v koncentraci nepřesahující 0,1 % v médiu. Některé *in vitro* dozrálé oocyty byly inkubovány ve 100 μ M taxolu (v 0,1 % DMSO) po dobu 45 min při 37°C. Takto připravené oocyty byly použity k imunocytochemii.

5.2.2 Fixace a imunocytochemie

K fixaci oocytů byly použity dva přístupy. První typem fixace byla inkubace oocytů při pokojové teplotě po dobu 30 min v 4 % paraformaldehydu (PFA) rozpuštěném v PBS s přidavkem 0,1 % polyvinyl–alkoholu (PVA). Pro detekci histonových modifikací byl použit druhý způsob fixace: inkubace 15 min. v PFA-Triton X-100 při 37 °C, následující po permeabilizaci živých buněk v 0,03 % Tween 20 v PBS-PVA při 37 °C po dobu 60 sec. Oocyty fixované prvním nebo druhým způsobem byly permeabilizovány 15 min. v PBS s přidavkem 0,04 % Triton X-100 a 0,3 % Tween 20. Po fixaci oocytů byly oocyty blokovány 15 min v 1 % BSA v PBS s Tween 20. Takto připravené oocyty byly inkubovány 1 hod. se specifickou protilátkou (v ředění 1:200): anti-SIRT1 (Abcam;

ab104833), anti- α tubulin (Cell Signaling Technology, Leiden Netherlands; #2144) anti-acetylovaný α tubulin (Abcam; ab24610), anti-H3K9me2/3 (Abcam; ab184677), anti-H3K4me2 (Abcam; ab7766), anti-ubiquitinovaný (K119) H2A (H2AK199ub; Cell Signaling Technology; D27C4). Po inkubaci s primárními protilátkami následovalo promytí v 1 % BSA v PBS s Tween 20 a inkubace se sekundárními protilátkami anti-myší a anti-králičí AlexaFluor 488 nebo 647 v koncentracích 1:200 po dobu 1 hod. Po promytí byly oocyty inkubovány 15 min. s faloidinem, pro lokalizaci β -aktinu, a poté znovu promyty (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:200). Takto ošetřené oocyty byly montovány na podložní skla pomocí Vectashield média obsahující 4'6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) pro vizualizaci chromatinu.

5.2.3 TUNEL assay

Fixované oocyty byly permeabilizovány 40 min. v 0,1% Triton X-100 v PBS obsahující 0,05 % NaN_3 . Oocyty byly dále inkubovány v podmínkách bez přístupu světla 1 hod. při teplotě 37 °C s fluorescein-konjugovaným dUTP a enzymem terminální deoxynukleotidyl transferázou (In Situ Cell Death Detection Kit, cat. No. 11684795910, Roche, Mannheim, Germany), dle manuálu výrobce. Nakonec byly takto ošetřené oocyty zamontovány na podložní skla pomocí Vectashield média obsahující 4'6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) pro vizualizaci chromatinu.

5.2.4 Analýza obrazu a ko-lokalizace

U oocytů podrobených imunocytochemii a TUNEL assay byla měřena denzita signálu příslušných barevných kanálů pomocí ImageJ softwaru (NIH, Bethesda, CA, USA). Tyto naměřené hodnoty denzity signálu byly vztaženy ke kontrolním oocytům ($\text{VC}=1$). Pro ko-lokalizaci SIRT1 s vřeténkem tvořeného α -tubulinem byl použit JACoP modul (Just Another Co-localization Plugin) podle Bolte a Cordelieres (Bolte and Cordelieres, 2006). Pro vyjádření ko-lokalizace a překrytí byla použita Costesovarandomizace (Costes'rand°), modifikovaný Pearsonův korelační koeficient R_r podle Costes (Costes et al., 2004), a Manderovy koeficienty překryvu (R , $M1$ a $M2$). Analýza ko-lokalizace byla provedena na dělícím vřeténku oocytů s použitím oblasti zájmu (Region of Interest, ROI).

5.2.5 Western blot

Ovariální tkáň byla vložena do lyzačního pufru na bázi 7M močoviny, obsahující inhibitor proteáz (Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Switzerland). Lyzát byl ředěn Laemmliho loading pufrem s přidavkem β -merkaptoethanolu. Vzorky podrobeny SDS-PAGE elektroforéze na předem připravených gradientových gelech (Biorad Laboratories, Steenvoorde, France). K blotování byl použit přístroj Trans-Blot Turbo™ Transfer Systém do PVDF membrány (Biorad Laboratories, Steenvoorde, France). Dále PVDF membrána byla blokována přes noc při 4 °C pomocí 5 % netučného mléka v TBS s 0,5 % Tween-20 (TBS-T). Poté byla membrána inkubována s myší monoklonální anti-SIRT1 (1:1,000). Ve stejných podmínkách byla použita myší monoklonální anti- β -aktin kontrolní protilátka (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., UK; sc47778; 1:1,000) pro detekci β -aktinu jako interního standardu. Následně byla membrána inkubována po dobu 1 hod. a pokojové teplotě s anti-myší nebo anti-králíčí IgG protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP) v TBS-T (Thermo Fisher Scientific; 1:10,000). Proteiny s adekvátní molekulární hmotností byly detekovány s použitím ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) a následně vizualizovány pomocí ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories, Steenvoorde, France).

5.2.6 Statistická analýza

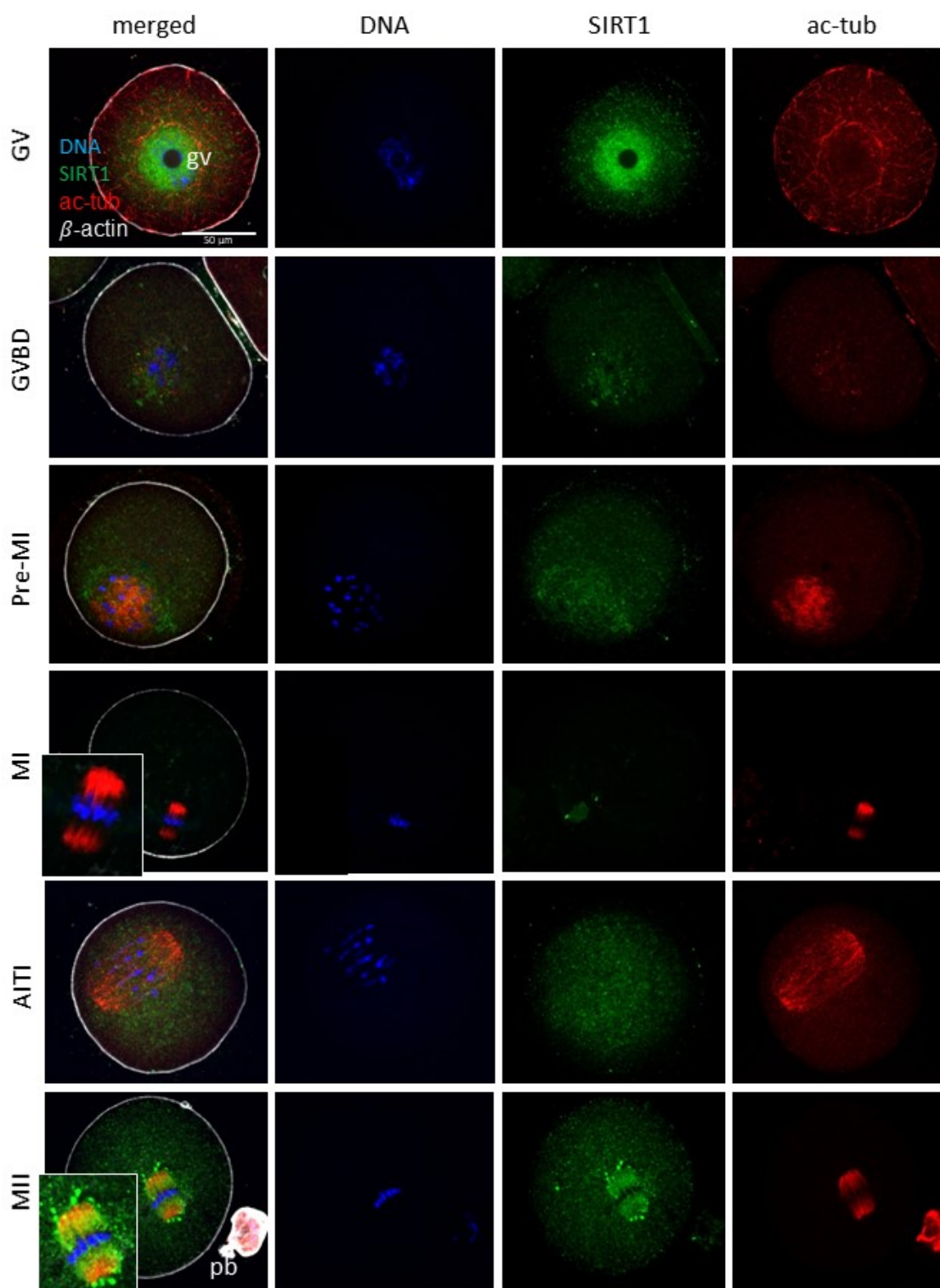
Data min. ze třech nezávislých experimentů byly vyjádřeny jako medián s příslušnými kvantily. Zpracování dat bylo provedeno pomocí analytického softwaru Statistica Cz 12 (StatSoft, USA). Pro srovnávající studii mezi studovanými skupinami byl použit test Mann-Whitney U test nebo Kruskal-Wallis ANOVA test. V případech signifikantního zjištění byly rozdíly mezi jednotlivými párovými skupinami posuzovány post-hoc, s použitím několikanásobného porovnávání průměrných hodnot. Úroveň statistické signifikance byla stanovena na $\alpha = 0,05$ s indikovanou p hodnotou.

6 Výsledky

6.1 Re-lokalizace SIRT1 během meiotického zrání oocyту

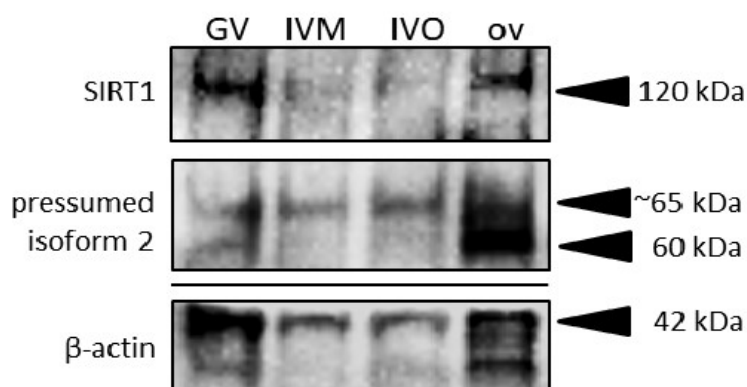
Cílem experimentu bylo popsat subcelulární lokalizaci SIRT1 v myším oocyту. V myším oocyту byla popsána subcelulární lokalizace během *in vitro* zrání (Obr. 6.1). Pro přehlednější vizualizaci meiotického zrání byl oocyt značen pomocí protilátek α -tubulin a β -aktin. V GV oocyту, tedy nezralém oocyту je lokalizace SIRT1 nejzřetelnější v zárodečném váčku (GV). Ooplazma GV oocyту vykazuje naopak slabý signál pro značený SIRT1. Během GVBD oocyту (znovu zahájení meiózy) je SIRT1 re-lokalizován do ooplazmy oocyту. Oocyt v MII vykazuje zřetelný vzor meiotického vřeténka (Obr.6.1), na rozdíl od oocyту v MI.

Vazebná specifita anti-SIRT1 protilátky (Ab104833) proti proteinu SIRT1 (Q923E4, UniProtKB) byla ověřena pomocí Western blotu (Obr. 6.2). Exprese SIRT1 byla testována v GV oocyту, *in vitro* zralém oocyту (IVM), *in vivo* zralém oocyту (IVO) a také v ovariální tkáni. Protilátka SIRT1 se vážala na protein o dvou různých molekulových hmotností. Deklarovaný band 120 kDa byl detekován podle výrobce protilátky SIRT1. Dále byl detekován bandy (60 a 65 kDa) o, které zřejmě náleží izoformě 2 SIRT1 s molekulovou hmotností 59,9 kDa (Obr. 6.2) Jako interní standart buněčné exprese byl použit β -aktin (41.7 kDa).



Obrázek 6.1 Relokalizace SIRT1 v závislosti na meiotické progresi. GV: oocyt ve stádiu zárodečného váčku je hodnocen jako nezralý oocyt. Pre-MI: oocyt v časně metafázi I. meiotického dělení. MI oocyt v metafázi I. meiotického dělení. AITI: oocyt mezi anafází I. a

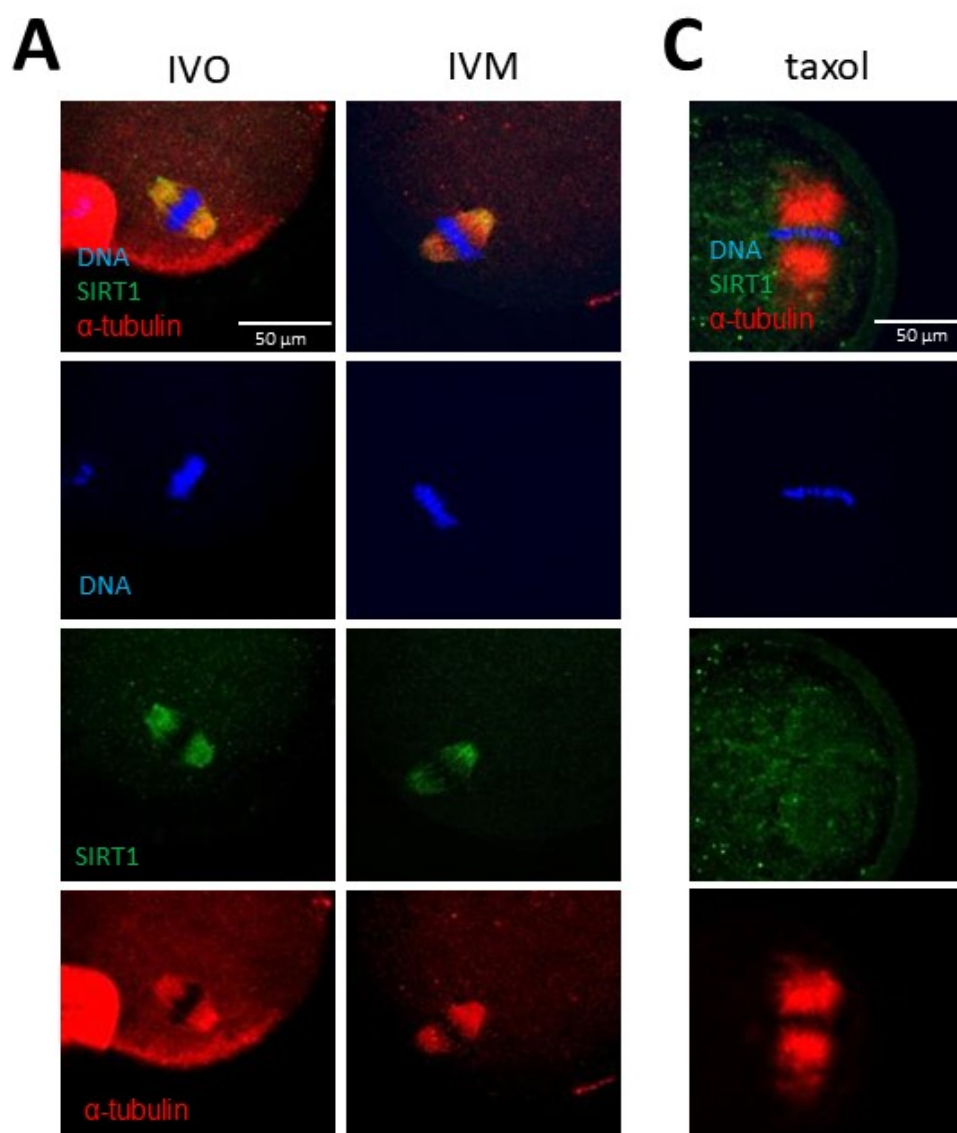
telofází I. meiotického dělení. MII: oocyt v metafázi II, s viditelným pólovým tělískem = pb (zralý oocyt). SIRT1 je lokalizován u nezralého oocyta přímo v GV. Po rozpadu zárodečného váčku dochází k re-lokalizaci SIRT1 do ooplazmy oocyta k postupné ztrátě signálu v MI. V MII oocytu SIRT1 vytváří vzor podobný dělicímu vřeténku.



Obrázek 6.2 Imunodetekce SIRT1. Western blot byl proveden z nezralých oocytů se zárodečným váčkem (GV), MII *in vitro* zralých oocytů (IVM), MII *in vivo* zralých oocytů (IVO) a z ovarální tkáně (ov). Byl detekován SIRT1 o velikosti 120 kDa a bandy, považované za izoformu 2 SIRT1 (59,9 kDa). Jako interní standart buněčné exprese byl použit β-aktin.

6.2 SIRT1 ve zralém oocytu vykazuje vzor dělicího vřeténka

Cílem tohoto experimentu bylo potvrzení ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinem vřeténka. Na základě pozorování SIRT1 subcelulární vzoru vřeténka z předchozího experimentu jsme potvrdili spojitost SIRT1 s cytoskeletální strukturou ve zralém oocytu (Obr. 6.3A). Ko-lokalizační analýza ukázala vysokou úroveň překrytí SIRT1 a α -tubulinu na meiotickém vřeténku IVO a IVM oocytů. Dále byla zjištěna silná spojitost SIRT1 s α -tubulinem v IVM oocytech (podle Pearsonova a Maderova koeficientu). Ko-lokalizace koeficientů jsou sumarizovány na obrázku uvedeném níže (Obr. 6.3B). Pro potvrzení asociace SIRT1 s tubulinem byly zralé MII oocyty kultivovány s taxolem, inhibitorem depolymerace tubulinu. Předpoklad, že SIRT1 bude vykazovat obdobný vzor distribuce jako tubulin, se v tomto experimentu nepotvrdil (Obr. 6.3C).



B

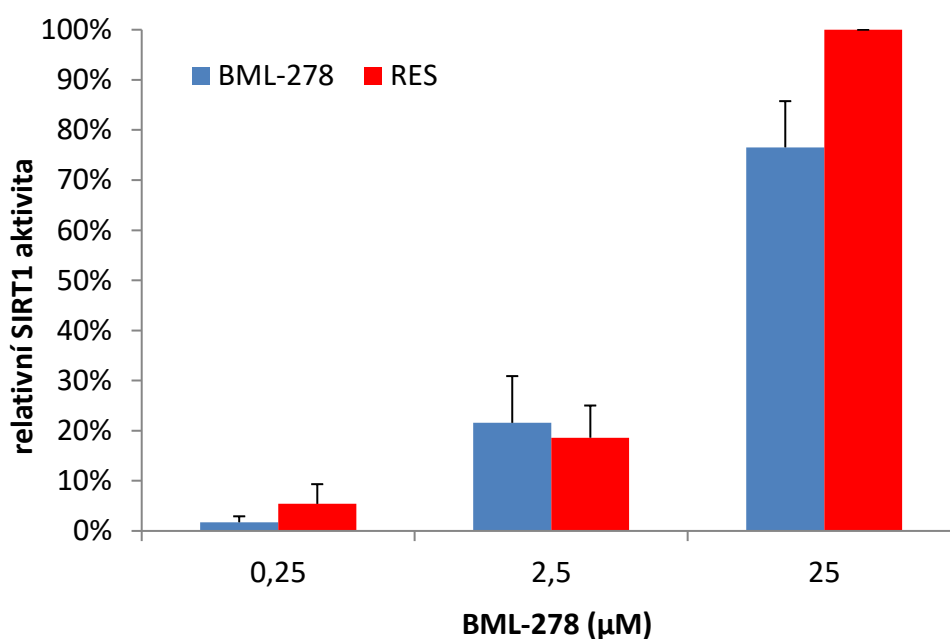
parameter	IVO	IVM
Pearson's coeff. (R_p) by Costes' rand°	0.243±0.030	0.632±0.039
Overlap coefficient (r)	0.745±0.009	0.802±0.017
Manders' M1 coefficient	0.439±0.074	0.942±0.020
Manders' M2 coefficient	0.472±0.056	0.835±0.027

Obrázek 6.3 Ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinem dělicího vřeténka. Imunocytochemické barvení DNA, SIRT1 a α -tubulinu (Obr. 6.3A). Zralé oocyty získané *in vivo* zráním (IVO) a *in vitro* zráním

(IVM) vykazovali podobnou ko-lokalitaci SIRT1 s α -tubulinem dělíčího vřeténka (Obr. 6.3B). Taxol vede ke stabilizaci mikrotubulů a rozptýlení SIRT1 do ooplazmy (Obr. 6.3C).

6.3 Porovnání aktivační schopnosti aktivátorů SIRT1

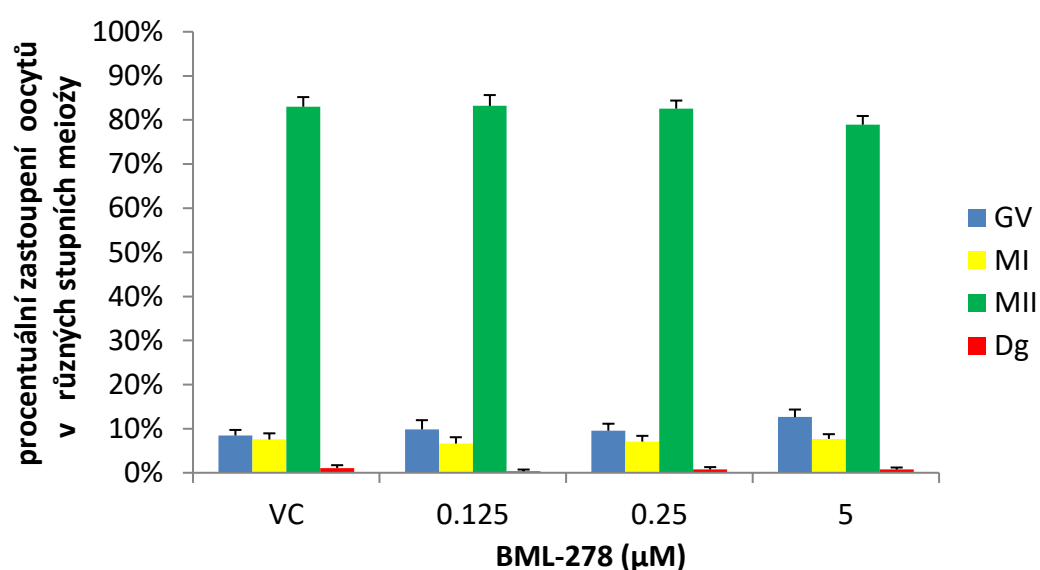
Pro účely specifické aktivace SIRT1 během *in vitro* maturace oocytů byl použit aktivátor BML-278. Před použitím byla ověřena jeho aktivační schopnost a porovnána s již známým nespecifickým aktivátorem proteinů z rodiny sirtiunů, resveratrol. Testování obou aktivátorů SIRT1 pomocí fluorometric SIRT1 Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK, ab156065) ukázalo, že oba dva aktivátory mají srovnatelnou schopnost zvyšovat aktivitu SIRT1, v závislosti na použité dávce.



Obrázek 6.4 Detekce SIRT1 aktivity po ovlivnění aktivátory BML-278 a resveratrolem. K testování aktivity čistého SIRT1 proteinu v podmínkách *in vitro* byl použit testovací kit podle protokolu. SIRTaktivita SIRT1 byla také ovlivňována resveratrolem (RES), který byl v koncentraci 25 μM použit jako pozitivní kontrola (=100%).

6.4 *In vitro* zrání oocytů v přítomnosti aktivátoru BML-278

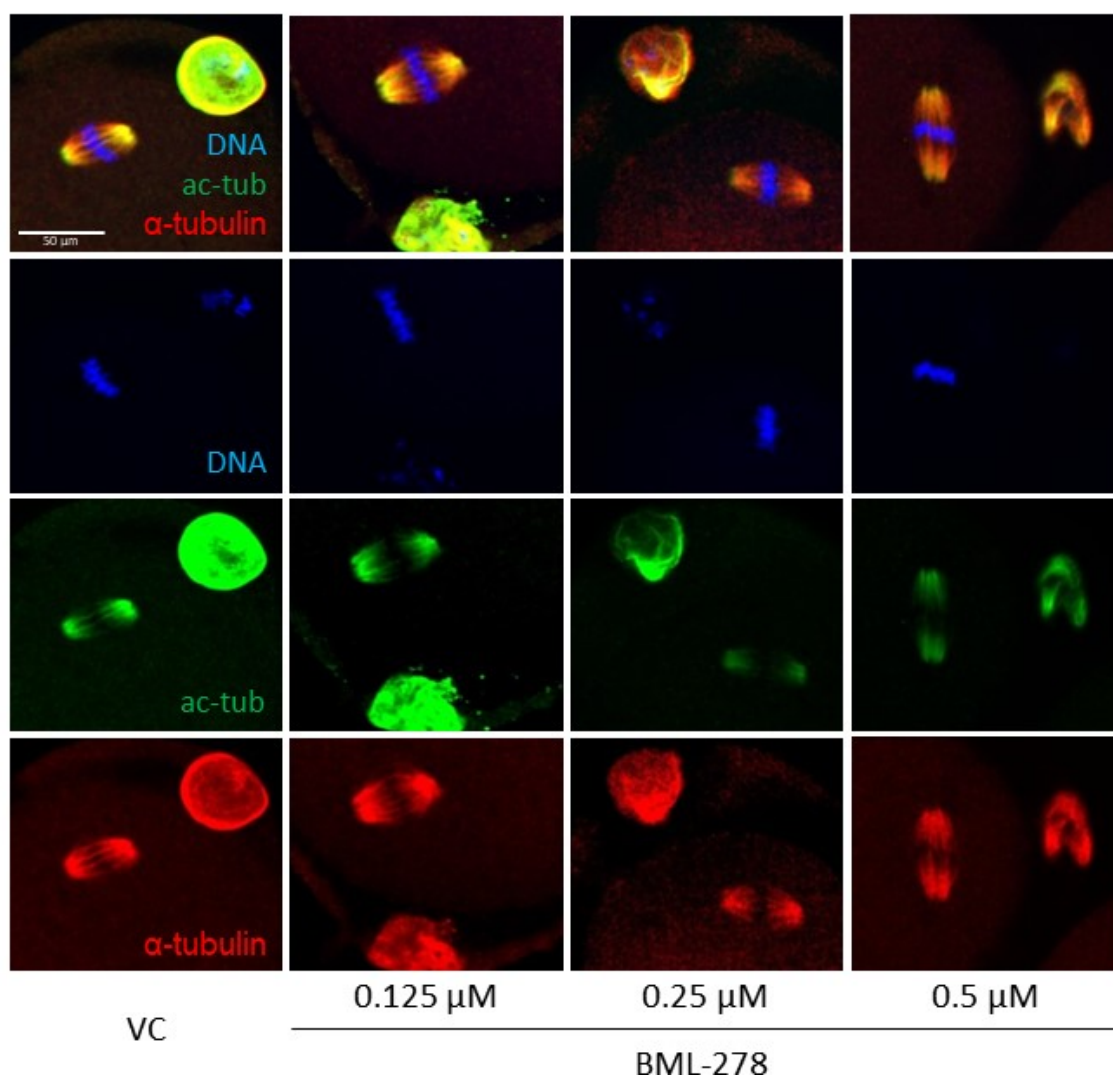
Naším cílem v tomto experimentu, bylo zjistit efekt různých koncentrací BML-278 na *in vitro* maturaci myších oocytů. Na základě výsledků výše popsaného experimentu a předběžných experimentů (data nejsou zobrazena) byly v tomto a dalších pokusech vybrány následující koncentrace aktivátoru BML-278: 0.125, 0.25 a 0.5 μM . Nebyl prokázán signifikantní efekt BML-278 na výsledek zrání oocytů po kultivaci 16 hod. v podmínkách *in vitro* (Obr. 6.5)



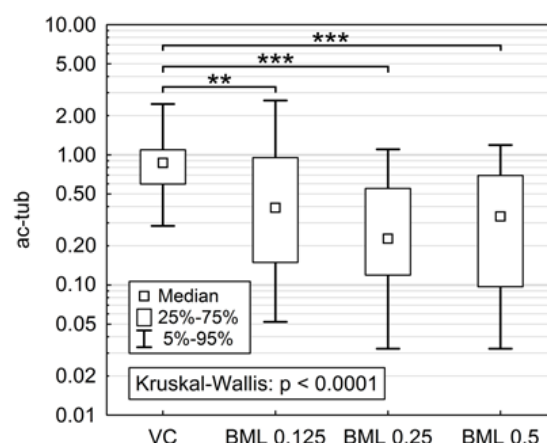
Obrázek 6.5 Efekt BML-278 na *in vitro* maturaci oocytů. Nebyl pozorován vliv BML-278 na zrání oocytů. GV: nezralý oocyt (germinal vesicle stage), MI: oocyt v metafázi I (metaphase I oocyte), MII: zralý oocyt s vyloučeným pólovým tělískem (metaphase II oocyte), Dg: degenerovaný oocyt (lýza, apoptóza).

6.5 SIRT1 snižuje acetylaci α -tubulinu vřeténka ve zralého oocyty

Cílem experimentu bylo hodnotit míru acetylace tubulinu po aktivaci SIRT1. Pro tento účel byl použit aktivátor BML-278 v koncentraci 0.125, 0.25 a 0.5 μM . Acetylace tubulinu byla měřena pomocí imunocytochemického barvení (Obr. 6.6), následované analýzou obrazu. Bylo zjištěno, že působení BML-278 v použitých koncentracích vedlo k signifikantnímu poklesu acetylovaného α -tubulinu (Obr. 6.7). Vzhledem k SIRT1 vzoru u zralého oocyty a efektu taxolu, považujeme působení deacetylační aktivity SIRT1 za časově omezené.



Obrázek 6.6 Imunocytochemické barvení DNA, acetylovaného tubulinu (ac-tub), a α -tubulinu. Oocyty byly ovlivněny BML-278 o koncentraci 0.125, 0.25 a 0.5 μM .



Obrázek 6.7 Acetylace tubulinu po aktivaci SIRT1 prostřednictvím BML-278 v *in vitro* dozrálých oocytech. BML-278 aktivuje SIRT1, jeho zvýšená aktivita umožňuje pokles acetylovaného tubulinu ve všech, námi použitých koncentracích BML-278.

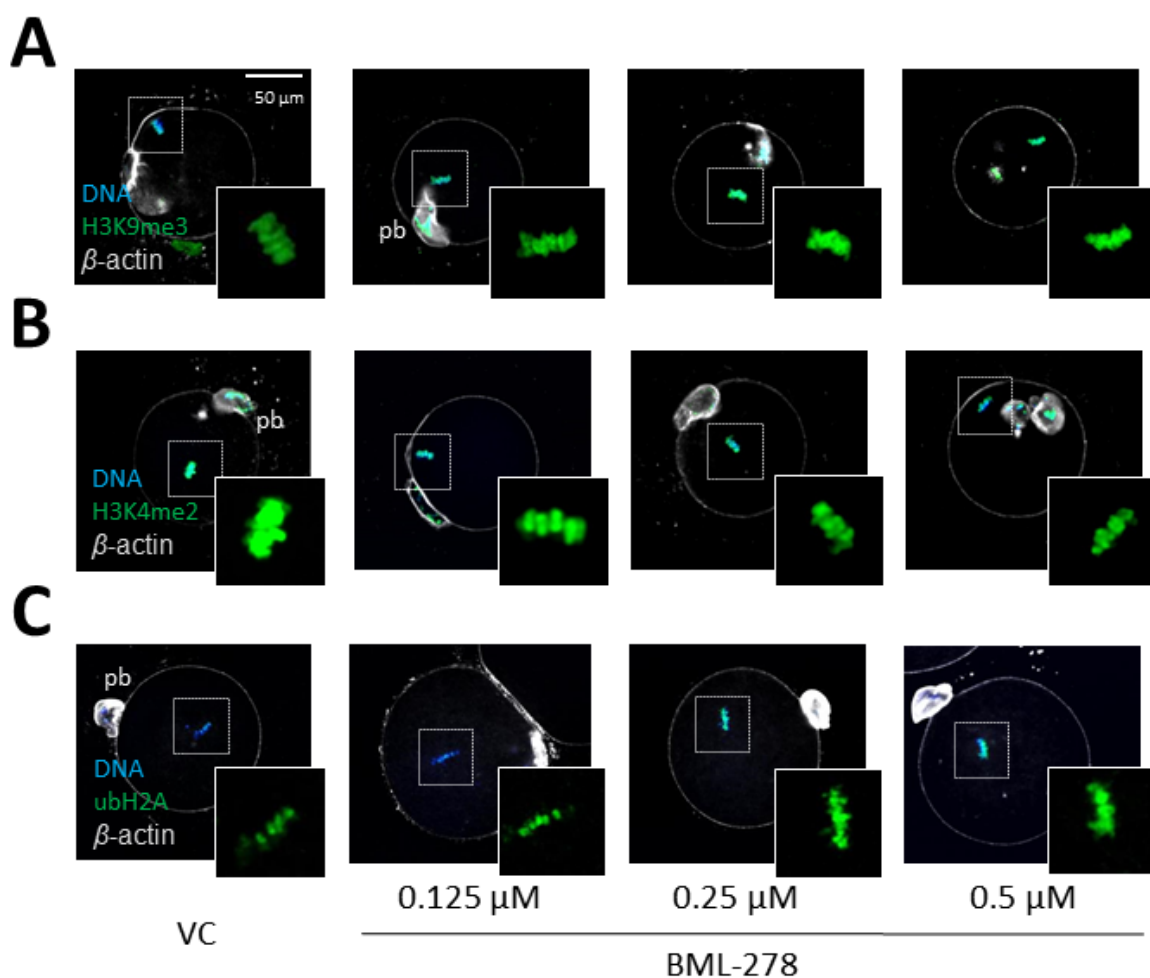
6.6 SIRT1 moduluje epigenom u zralého oocyty

Ačkoliv SIRT1 je výlučně imunolokalizován na vřetenu zralého oocyty, epigenetický vliv SIRT1 na oocyty lze uvažovat na základě existujících nálezů (Adamkova et al., 2017). Cílem tohoto experimentu tedy bylo objasnit, zda SIRT1 má vliv na epigenom zralého oocyty a jeho DNA fragmentaci. Proto bylo analyzováno několik post-translačních modifikací histonů, které byly popsány již dříve jako pozitivní a negativní markery stability genomu. Jsou to trimethylovaný histon H3 na lyzinu K9 (H3K9me3) (Keniry et al., 2016), resp. dimethylovaný histon H3 na lyzinu 4 (H3K4me2) (Faucher and Wellinger, 2010). K analýze byl dále vybrán ubiquitinovaný H2A Lysinu 199 (H2AK199ub), a to vzhledem k souvislosti SIRT1 s ubiquitin-asociovanými proteiny (Nevoral and Sutovsky, 2017). Aktivátor SIRT1 BML-278 byl také posuzován v kontextu DNA poškození pomocí metody TUNEL assay, kdy BML-278 vedl ke snížení DNA zlomů.

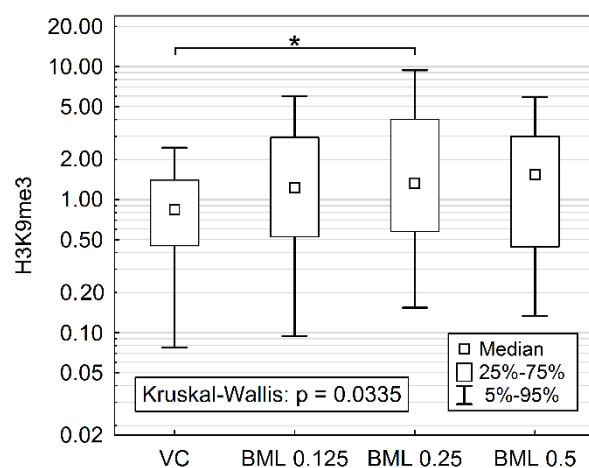
Pozorovali jsme několikanásobné zvýšení intenzity signálu H3K9me3 po ovlivnění 0,25μM BML-278, $2,70 \pm 0,50$ (medián \pm S.E.M.) ve srovnání s kontrolními oocyty $1,0 (\pm 0,11)$ (Obr. 6.8A a Obr. 6.9). Naopak, intenzita signálu H3K4me2 byla signifikantně snížena na 0,69 a 0,74 po ovlivnění 0,125 a 0,25μM BML-278. (Obr. 6.8B a Obr. 6.10). Zvýšení H2AK199ub bylo detekováno u oocytů po ovlivnění BML-278 v koncentraci 0,25μM ($2.46 \pm 0,33$ versus $1,0 \pm$

0,17; Obr. 6.8C a Obr.6.11D), konzistentně s heterochromatinovým markerem H3K9me3 (Obr. 6.8A a Obr. 6.9). V souladu s výsledky H3K9me3 a H3K4me2 jsme pozorovali klesající integrální hustotu DNA poškození u zralých oocytů ovlivněných BML-278 (0,125 a 0,25 μ M) ve srovnání s kontrolními oocyty (0,36-0,47 vs 1,0; Obr. 6.12)

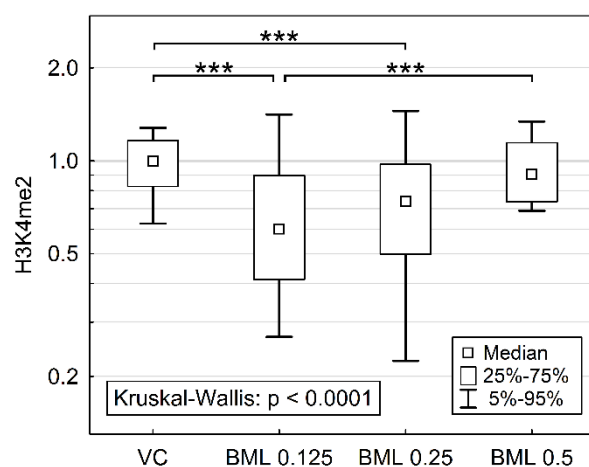
Naše výsledky naznačují, že SIRT1 v důsledku působení BML-278 utváří histonový kód a charakter chromatinu ve zralém oocyty, přestože není lokalizován na chromatinu v tomto stádiu. Domníváme se tedy, že SIRT1 moduluje epigenetický kód histonů v nezralém GV oocyty, která je předávána do zralého oocyty. Tato domněnka je podpořena také sledováním SIRT1 v GV oocyty a byla předmětem dalšího experimentu.



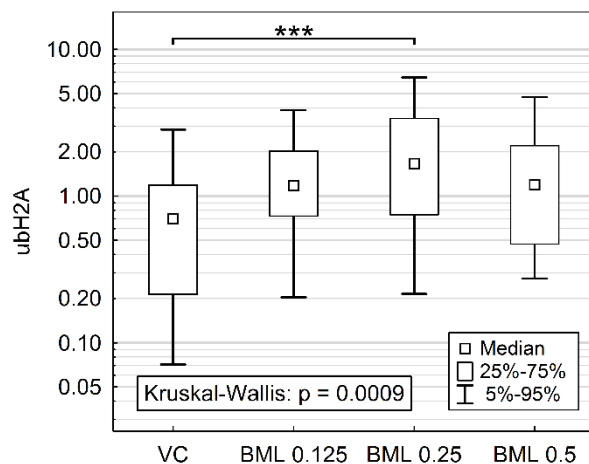
Obrázek 6.8 Histonové modifikace po aktivaci SIRT1 prostřednictvím BML-278 v *in vitro* dozrálých oocytech. Markerem transkripční represe byl zvolen H3K9me3 (5.8A). Jako marker transkripční aktivity byl vybrán H3K4me2 (5.8B). Dále byl použit H2AK199ub v souvislosti SIRT1 s ubiquitin asociovanými proteiny (5.8C).



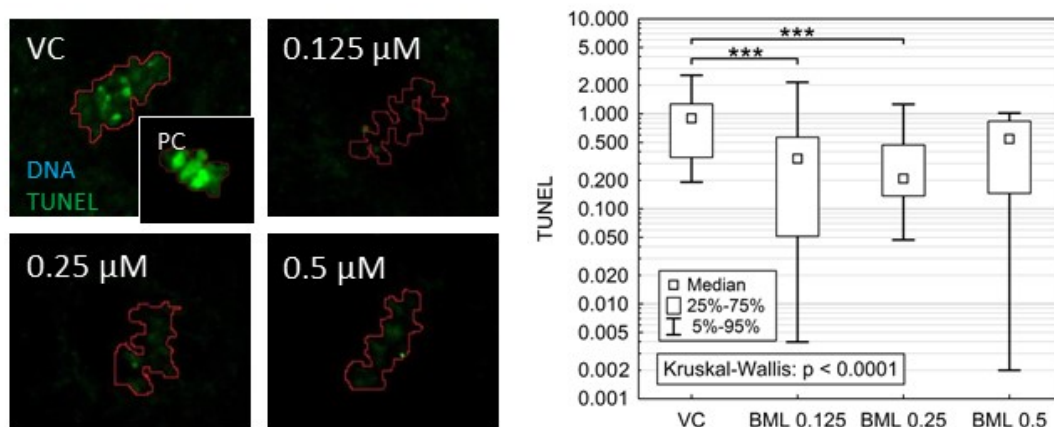
Obrázek 6.9 Grafické vyhodnocení působení BML-278 na H3K9me3 v MII oocytech. Zvýšení trimethylovaného H3K9 (H3K9me3) bylo signifikantní, po ovlivnění BML-278 v koncentraci 0,25μM, $2,70 \pm 0,50$ (medián \pm S.E.M.) v porovnání s kontrolními oocyty $1,0 (\pm 0,11)$.



Obrázek 6.10 Grafické vyhodnocení působení BML-278 na H3K4me2 v MII oocytech. Intenzita signálu H3K4me2 byla signifikantně snížena na 0,69 a 0,74 po ovlivnění 0,125 a 0,25μM BML-278.



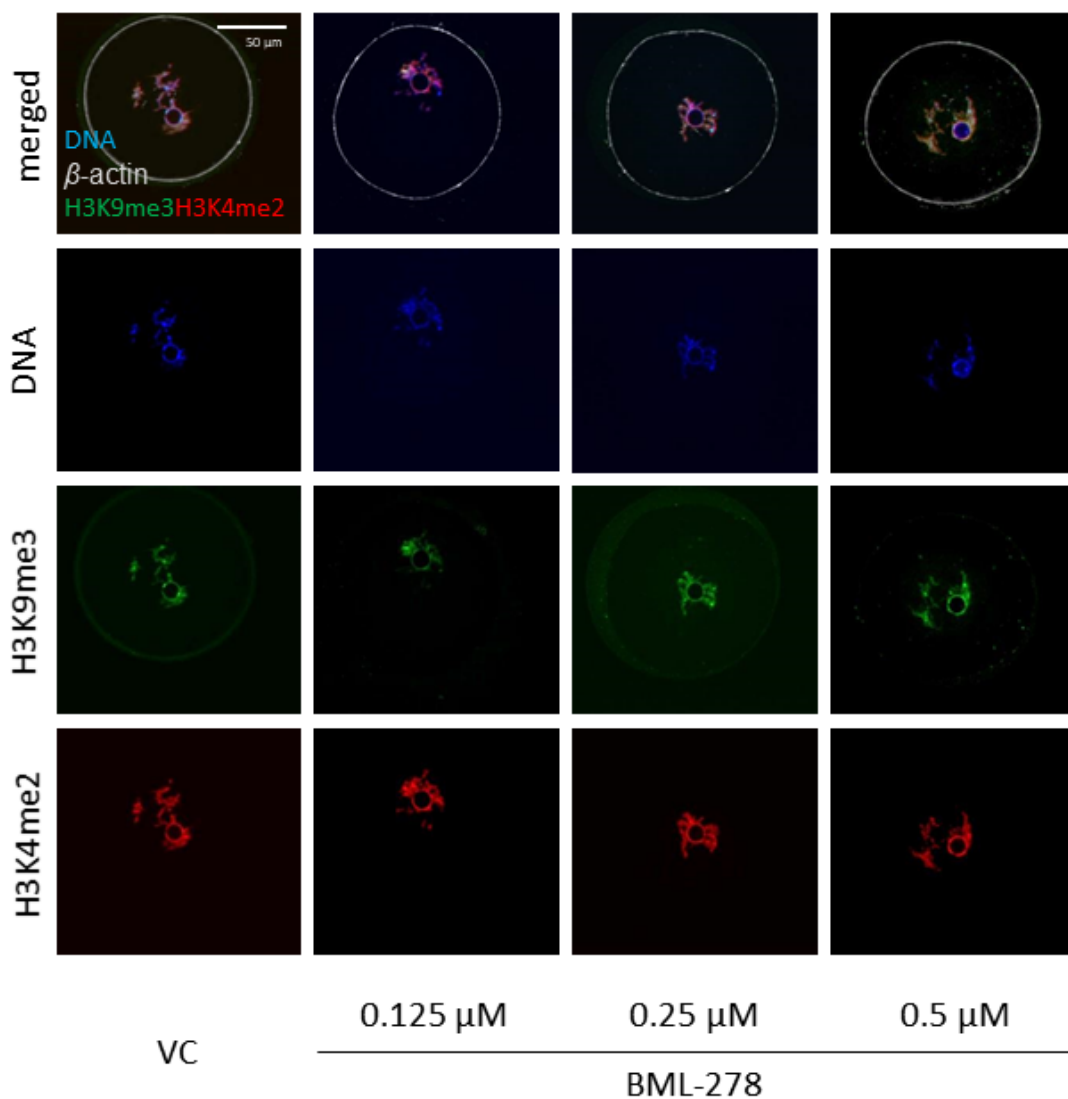
Obrázek 6.11 Grafické vyhodnocení působení BML-278 na H2AK199ub v MII oocytech. Signifikantní zvýšení H2AK199ub bylo detekováno u oocytů po ovlivnění BML-278 v koncentraci 0,25 μ M (2.46 \pm 0,33 versus 1,0 \pm 0,17).



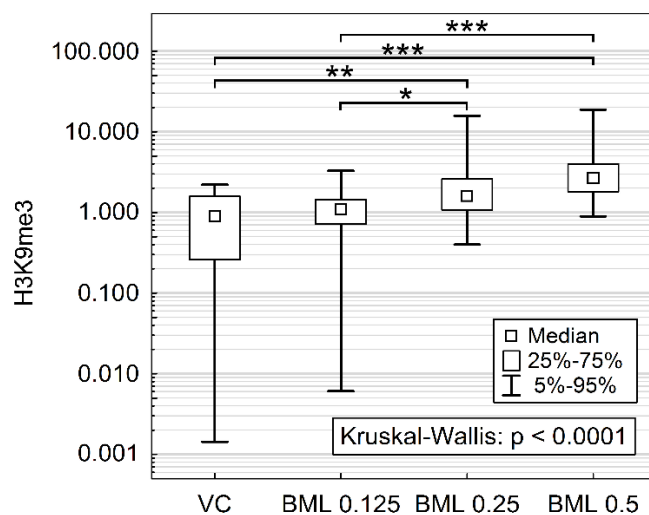
Obrázek 6.12 DNA fragmentace po aktivaci SIRT1 prostřednictvím BML-278 v *in vitro* dozrálých oocytech, TUNEL assay. Zvýšení aktivity SIRT1 pomocí BML-278 vedlo u zralých oocytů k poklesu integrální hustoty DNA poškození (0,125 a 0,25 μ M) v porovnání s kontrolními oocyty (0,36-0,47 vs. 1,0).

6.7 SIRT1 ovlivňuje histonový kód v GV oocytu

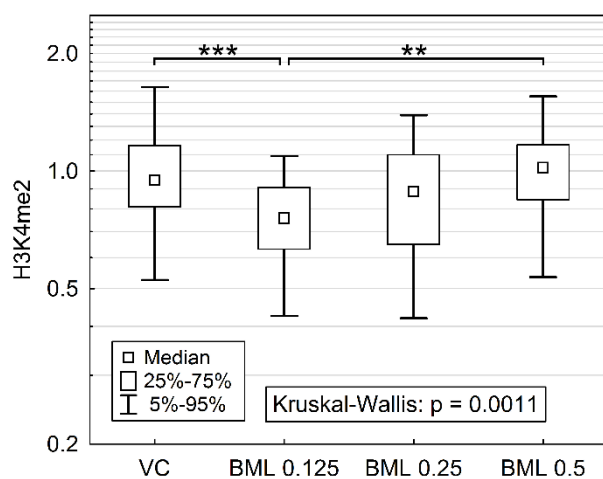
Cílem posledního experimentu bylo ověřit, zda SIRT1 mění histonový kód v GV nezralého oocytu. V experimentu byly GV oocyty kultivovány 16 hod. v podmínkách potlačující spontánní meiotické zrání (M16-IBMX) s přidavkem SIRT1 aktivátoru BML-278. K testování této hypotézy bylo použito imunolokalizace H3K9me3 a H3K4me2, následované analýzou obrazu (Obr. 6.13). Po ovlivnění 0,25 μ M a 0,5 μ M BML-278 byl pozorován nárůst H3K9me3 ($2,91 \pm 0,83$ a $4,84 \pm 1,16$ versus $1,0 \pm 0,15$; Obr 6.14). Naopak BML-278 neměl vliv na H3K4me2 (Obr. 6.15). Změny, které byly pozorované u H3K9me3 poukazují na epigenetické působení SIRT1 v nezralém GV oocytu. Na základě tohoto sledování se lze domnívat, že epigenetický vliv SIRT1 na GV oocyt se po znovuzahájení meiózy mění na ne-epigenetické působení. Tyto zjištění jsou v souladu s předcházející pozorováním, kdy SIRT1 je po rozpadu zárodečného váčku v oblasti perichromatinu a následně ko-lokalizuje s dělícím vřeténkem ve zralém MII oocytu.



Obrázek 6.13 Histonové modifikace po aktivaci SIRT1 prostřednictvím BML-278 v nezralých GV oocytech. Jako marker transkripční represe byl vybrán H3K9me3. Dále byl posuzován marker související s transkripční aktivitou, H3K4me2.



Obrázek 6.14 Grafické vyhodnocení působení BML-278 na H3K9me3 v nezralých GV oocytech
V koncentracích 0,25 μ M a 0,5 μ M vede BML-278 ($2,91 \pm 0,83$ a $4,84 \pm 1,16$ versus $1,0 \pm 0,15$) ke zvýšení hladiny H3K9me3 v nezralém GV oocyty.



Obrázek 6.15 Grafické vyhodnocení působení BML-278 na H2AK199ub v nezralých GV oocytech.
Intenzita signálu H3K4me2 není ovlivněna působením BML-278 v GV oocyty.

7 Diskuze

Sirtuiny představují potenciální skupinu proteinů, které jsou intenzivně studovány na poli reprodukční medicíny a ART (Liu et al., 2017; Tatone et al., 2018; Valerio et al., 2018). V souladu s předcházejícími studiemi (Di Emidio et al., 2014; Kwak et al., 2012; Sato et al., 2014; Zhang et al., 2014) jsme detekovali rozdílným způsobem SIRT1 v zárodečném váčku (GV) nezralého oocyty a SIRT1 ve zralém metafázním II (MII) oocyty. SIRT1 je přítomný v GV, nicméně po zhroucení zárodečného váčku (GVBD) dochází k jeho difúznímu rozptýlení v ooplazmě a nakonec k vytvoření vzoru podobného dělicímu vřeténku ve zralém MII oocyty (Obr. 6.1). Toto pozorování je srovnatelné s dalšími histon deacetylázami (Li et al., 2017; Ling et al., 2018; Zhang et al., 2017). Na základě tohoto zjištění jsme odhalili deacetylační reakci SIRT1 cílenou k α -tubulinu vřeténka zralého MII oocyt. V naší studii jsme použili ko-lokalizační analýzu, kvantifikovali asociaci SIRT1 s α -tubulinem vřeténka a odhalili překryv obou dvou faktorů v *in vivo* a *in vitro* zralých oocytech.

SIRT1 svojí lokalizací ve zralém oocyty vytváří vzor podobný dělicímu vřeténku (Obr.6.1). Tento vzor je pravděpodobně výsledkem postupné re-lokalizace SIRT1 se závislostí na průběhu meiotického dělení. Tato hypotéza je v souladu, s již popsanou deacetylací tubulinu vřeténka prostřednictvím HDAC3 a HDAC8.

Vytváření vzoru dělicího vřeténka SIRT1 nás směřovalo k potvrzení ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinem vřeténka. Potvrdili jsme překryv SIRT1 s α -tubulinem u *in vitro* a *in vivo* zralých oocytů (Obr.6.3). Nicméně oocyty dozrálé *in vitro* a *in vivo* podmínkách mají paradoxně rozdílné hodnoty koeficientů ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinu (Pearsonův a Maderův koeficient, Obr 6.3 B), kdy *in vitro* dozrálé oocyty měly silnější spojitost SIRT1 s α -tubulinem než *in vivo* zralé oocyty. To nás vede k myšlence, že lokalizace SIRT1 na vřeteni je časově omezená a SIRT1 záhy po ustanovení MII oocyty vřeteno opouští. *In vivo* zralé oocyty jsou pro nás fyziologickou kontrolou ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinem. Ačkoliv tato ko-lokalizace SIRT1 s α -tubulinem je slabší v porovnání s *in vitro* dozrálými oocyty. Deacetylase tubulinu může být spoluodpovědná za připojení kinetochor k mikrotubulům a v konečném kontextu za udržení euploidie ve zralém oocyty (Li et al., 2017; Zhang et al., 2017). Navíc deacetylase α -tubulinu může hrát roli v destabilizaci celého vřeténka umožňující jeho dynamickou formaci. To nás vedlo k myšlence, že SIRT1 působí spíše na tubulin před stabilizací samotného vřeténka než po jeho stabilizaci.

Tuto myšlenku jsme potvrdili užitím taxolu, který vede ke stabilizaci mikrotubulů. Působení HDACs na tubulin dělicího vřeténka je tedy vnímáno jako nezbytné pro vytvoření vřeténka v oocytech (Ling et al., 2018; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2014), přestože acetylace tubulinu je markerem pro stabilní mikrotubuly (Depennart et al., 1988). K dalším alternativním cestám, jak může SIRT1 ovlivňovat mikrotubulární polymerizaci je prostřednictvím regulace PLK1, která je taktéž lokalizovaná na dělicím vřeténku oocyty (Kim et al., 2015).

Naši hypotézu o postupné re-lokalizaci SIRT1 se závislostí na průběhu meiotického dělení jsme podpořili těmito nálezy a) téměř nepozorovaným signálem SIRT1 na vřeténku oocytů v metafázi I a následným pozvolným vytvářením vřeténku podobného vzoru během meiotické progrese, b) nespojitostí SIRT1 s over-polymerací α -tubulinu u oocytů, které bylo indukováno taxolem, c) spojitostí úrovně překrytí SIRT1 s α -tubulinem vřeténka v *in vivo* zralých oocytech. *In vivo* zralé oocyty představují fyziologickou kontrolu pro *in vitro* experimenty s nízkým ko-lokalizačním koeficientem překrytí SIRT1 a α -tubulinu, který podtrhuje snižující se SIRT1 požadavek vřeténka oocyty pro dosažení metafáze II. Tyto nálezy jsou v souladu s takzvanou přípravou vřeténka zralého oocyty pro následné změny, k nimž dochází během oplození (Schatten et al., 1988).

Mimo ne-epigenetických substrátů působí SIRT1 rovněž jako modulační faktor epigenetického kódu (Adamkova et al., 2017; Nevoral and Sutovsky, 2017). Z tohoto důvodu jsme po aktivaci SIRT1 v myších oocytech studovali několik histonových modifikací, které jsou potenciálním cílem SIRT1 i během zrání oocytů (Obr. 6.8). Naše sledování potvrdilo předpoklad, že SIRT1 mění funkčně histonový kód směrem k chromatinové stabilizaci a k ochraně DNA před poškozením podobně jako ostatní členové sirtuinové rodiny (Ren et al., 2016; Vazquez et al., 2016). K modulaci epigenomu oocytů může docházet přímo přes epigenetické substráty, stejně jako nepřímo prostřednictvím ne-epigenetických substrátů, modulujících následně histonový kód. Například histon methytransferázy, které ovlivňují methylační stav histonového oktameru. Je známo, že SIRT1 také ovlivňuje pozitivně histon methyltransferázu SUV39H1 (Bosch-Presegue et al., 2011), která podporuje trimethylaci histonu H3 na lyzinu K9 (H3K9me3) (Peters et al., 2003). Námi sledovaný pokles v intenzitě signálu H3K4me2 lze vysvětlit stimulací histon demethylázy LSD1/KDM1A, která by mohla v myších oocytech demethylovat H3K4me2 společně se SIRT1 v ko-represorovém komplexu (Mulligan et al., 2011)

Kromě H3K9me3 a H3K4me2 jsme se zaměřili na ubiquitinaci histonu H2A v pozici lysin K199 (H2AK199ub). Naše pozorování podporuje hypotézu, kde H2AK199ub působí jako heterochromatinový marker v oocytech, na rozdíl od somatických buněk, kde ubiquitovaný H2A doprovází DNA poškození (Ginjala et al., 2011; Marteiijn et al., 2009). Domněnka interakce SIRT1 s ubiquitin-proteasomálním systémem je souladu s předcházejícími studiemi, kde je popsána schopnost SIRT1 interagovat s E3 ubiquitin ligázou MDM2 (Adamkova et al., 2017; Cao et al., 2005; Wang et al., 2004) a schopností stabilizovat chromatin ve formě heterochromatinu (shrnutí v Wienken et al., 2017).

Výše uvedené histonové post-translační modifikace se vyskytují u zralých oocytů i přesto, že subcelulární lokalizace SIRT1 není spojena s kondenzovanými chromozomy. Tento náález nás vede k postulátu, že dochází k dědičnosti histonových změn, získaných dříve před vyvinutím zralého oocyty. Proto jsme testovali epigenetické změny histonu H3 v GV oocytech po aktivaci SIRT1 pomocí BML-278. Podle našich výsledků je histon H3 na lyzinu K9 a K4 modifikován v GV oocyty v závislosti na SIRT1. Toto sledování podporuje protektivní úlohu aktivace SIRT1 v oocytech, manifestovanou nepoškozenou integritou chromatinu (Demond et al., 2016; Gahurova et al., 2017). Tyto nálezy nás vedou k hypotéze, že zralý oocyt dědí histon H3K9me3 z GV oocyty, kde je ovlivňován pomocí SIRT1. Naše výsledky naznačují, že vyšší koncentrace BML-278 (0.25 a 0.5 μ M) řídí modulaci H3K4me2 spíše v pozdějších meiotických stádiích než v GV a to zapojením LSD1/KDM1A demethylázy (Mulligan et al., 2011). Tento předpoklad je podpořen pozorováním distribuce LSD1 na vřeténku v somatických buňkách (Lv et al., 2010). Můžeme se tedy domnívat, že ve zralém oocyty interakce SIRT1 a LSD1 vede k modulaci H3K4me2.

Zdá se, že SIRT1 má schopnost rychle přepínat svůj epigenetický a ne-epigenetický modus molekulární odpovědi v nezralém GV oocyty a zralém MII oocyty. Nezralý GV oocyt v prvním meiotickém bloku nabízí široké časové okno pro epigenetické působení SIRT1 během růstu oocytů (Tomizawa et al., 2012; Zheng et al., 2016). Naopak zralý oocyt zastavený v časově omezeném období metafázi II má vysoce kondenzovaný chromatin, který není na tolik přístupný pro epigenetické modifikace. V souladu s dvojím epigenetickým a ne-epigenetickým modelem molekulární akce je imunodetekce 60 kDa band, předpokládaná izoforma 2 SIRT1. Tato izoforma zjevně mění svojí molekulovou hmotnost na 65 kDa během zrání oocytů. Lze předpokládat, že je tato změna indukována post-translační modifikací (Du et al., 2018; Han et

al., 2017; Peng et al., 2015). Alternativním vysvětlením této změny je interakce s dalšími proteiny (Jiang et al., 2017) u zralého MII oocyty. Přesný popis proteinů interagujících se SIRT1 a objasnění fyziologické role post-translačních modifikací SIRT1 během zrání oocytů, oplození a embryonálního vývoje je předmětem dalšího budoucího výzkumu.

Zjistili jsme, že SIRT1 je histon deacetyláza působící na meiotické zrání oocytů jako signální molekula, ovlivňující epigenetickou a ne-epigenetickou regulaci. SIRT1 vykazoval buněčnou lokalizaci v závislosti na progresu meiotického dělení. V nezralém GV oocyty byl SIRT1 lokalizován v jádře, zde jsme potvrdili jeho funkci epigenetického modulátoru. Lokalizovali jsme signál SIRT1 rovněž v *in vitro* a *in vivo* zralých oocytech. Imunocytochemická detekce prokázala, že SIRT1 vytváří v těchto oocytech vzor dělicího vřeténka a v obou dvou případech jsme ko-lokalizovali SIRT1 s α -tubulinem vřeténka. Následně jsme zjistili, že SIRT1 ve zralém oocyty snižuje signifikantně acetylaci tubulinu. SIRT1 ovlivňuje rovněž histonový kód ve zralém oocyty, jehož modulace se zdá být přenesena z GV oocytů. Mimoto jsme prokázali, že SIRT1 působí protektivně na integritu DNA chromatinu zralých oocytů. Přestože BML-278 neměl vliv na výsledný počet zralých oocytů pocházejících z *In vitro* maturace, domníváme se, že může mít vliv na zvýšení vývojové kompetence oocytů. Tuto hypotézu je nutné dále ověřit pomocí *in vitro* oplození a kultivace embryí.

8 Souhrn

Výsledky popsané v rámci předložené diplomové práce jsou shrnuty níže:

- SIRT1 je přítomný v GV, zrajících a MII oocytech.
- V *in vitro* a *in vivo* dozrálých MII oocytech SIRT1 vytváří vzor podobný dělicímu vřeténku.
- SIRT1 má fyziologickou přítomnost v *in vivo*, *in vitro* zralých oocytech, nezralých GV oocytech a v ovariích myši. Exprese SIRT1 byla potvrzena pomocí western blotu.
- Testování aktivační schopnosti aktivátorů BML-278 a resveratrolu ukázalo na podobnou schopnost aktivovat SIRT1.
- Zvýšená aktivita SIRT1 neměla vliv na výsledek *in vitro* maturace z pohledu počtu zralých oocytů.
- SIRT1 aktivně snižuje acetylaci tubulinu dělicího vřeténka.
- SIRT1 ovlivňuje histonový kód v nezralém oocytu, který vede ke stabilitě chromatinu a k zajištění integrity chromozomů během meiózy.
- Změny histonového kódu v důsledku aktivace SIRT1 v GV oocytech zřejmě předurčují histonový kód v MII oocytech a poukazují tak na schopnost přenosu těchto změn napříč meiotický zráním.
- SIRT1 snižuje DNA poškození v MII oocytech, což je pozitivní efekt z pohledu vývojové kompetence.
- Výsledky dosažené v této diplomové práci budou použity jako součást publikace v časopisu s impakt faktorem.

9 Seznam literatury

- Adamkova, K., Yi, Y.J., Petr, J., Zalmanova, T., Hoskova, K., Jelinkova, P., Moravec, J., Kralickova, M., Sutovsky, M., Sutovsky, P., *et al.* (2017). SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *Journal of animal science and biotechnology* 8, 83.
- Adhikari, D., Zheng, W.J., Shen, Y., Gorre, N., Hamalainen, T., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I., Lan, Z.J., and Liu, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 19, 397-410.
- Assey, R.J., Hyttel, P., Greve, T., and Purwantara, B. (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37, 335-344.
- Baker, J., Hardy, M.P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A.R., and Efstratiadis, A. (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10, 903-918.
- Baker, T.G. (1963). A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences* 158, 417-+.
- Balaban, B., and Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive biomedicine online* 12, 608-615.*
- Bedalov, A., Gathbonton, T., Irvine, W.P., Gottschling, D.E., and Simon, J.A. (2001). Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15113-15118.
- Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M., and Sinclair, D.A. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277, 45099-45107.
- Bolte, S., and Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224, 213-232.
- Borra, M.T., O'Neill, F.J., Jackson, M.D., Marshall, B., Verdin, E., Foltz, K.R., and Denu, J.M. (2002). Conserved enzymatic production and biological effect of O-acetyl-ADP-ribose by silent information regulator 2-like NAD(+)-dependent deacetylases. *J Biol Chem* 277, 12632-12641.
- Borra, M.T., Smith, B.C., and Denu, J.M. (2005). Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280, 17187-17195.
- Bosch-Presegue, L., Raurell-Vila, H., Marazuela-Duque, A., Kane-Goldsmith, N., Valle, A., Oliver, J., Serrano, L., and Vaquero, A. (2011). Stabilization of Suv39H1 by SirT1 Is Part of Oxidative Stress Response and Ensures Genome Protection. *Mol Cell* 42, 210-223.

Brankin, V., Quinn, R.L., Webb, R., and Hunter, M.G. (2005). Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 28, 367-379.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y.X., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.

Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.

Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L., and Degross, F. (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol Biol Cell* 14, 3821-3833.

Cinco, R., Digman, M.A., Gratton, E., and Luderer, U. (2016). Spatial Characterization of Bioenergetics and Metabolism of Primordial to Preovulatory Follicles in Whole Ex Vivo Murine Ovary. *Biol Reprod* 95, 12.

Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.

Costa Cdos, S., Rohden, F., Hammes, T.O., Margis, R., Bortolotto, J.W., Padoin, A.V., Mottin, C.C., and Guaragna, R.M. (2011). Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPARgamma1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obesity surgery* 21, 356-361.

Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., and Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal* 86, 3993-4003.

da Silva, S.J.M., Bayne, R.A.L., Cambray, N., Hartley, P.S., McNeilly, A.S., and Anderson, R.A. (2004). Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol* 266, 334-345.

Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10042-10047.

David, G.F.X., Kumar, T.C.A., and Baker, T.G. (1974). UPTAKE OF TRITIATED-THYMIDINE BY PRIMORDIAL GERMINAL CELLS IN OVARIES OF ADULT SLENDER LORIS. *J Reprod Fertil* 41, 447-+.

De la Fuente, R., and Eppig, J.J. (2001). Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: Companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol* 229, 224-236.

- De La Fuente, R., Viveiros, M.M., Burns, K.H., Adashi, E.Y., Matzuk, M.M., and Eppig, J.J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* 275, 447-458.
- Debey, P., Szollosi, M.S., Szollosi, D., Vautier, D., Grousse, A., and Besombes, D. (1993). COMPETENT MOUSE OOCYTES ISOLATED FROM ANTRAL FOLLICLES EXHIBIT DIFFERENT CHROMATIN ORGANIZATION AND FOLLOW DIFFERENT MATURATION DYNAMICS. *Mol Reprod Dev* 36, 59-74.
- Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V.C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272, 6823-6826.
- Dekel, N., and Beers, W.H. (1978). Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4369-4373.
- Demond, H., Trapphoff, T., Dankert, D., Heiligentag, M., Grummer, R., Horsthemke, B., and Eichenlaub-Ritter, U. (2016). Preovulatory Aging In Vivo and In Vitro Affects Maturation Rates, Abundance of Selected Proteins, Histone Methylation Pattern and Spindle Integrity in Murine Oocytes. *PLoS One* 11, e0162722.
- Denomme, M.M., and Mann, M.R.W. (2012). Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction* 144, 393-409.
- Depennart, H., Houliston, E., and Maro, B. (1988). POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF TUBULIN AND THE DYNAMICS OF MICROTUBULES IN MOUSE OOCYTES AND ZYGOTES. *Biol Cell* 64, 375-378.
- Dewailly, D., Robin, G., Peigne, M., Decanter, C., Pigny, P., and Catteau-Jonard, S. (2016). Interactions between androgens, FSH, anti-Mullerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update* 22, 709-724.*
- Di Emidio, G., Falone, S., Vitti, M., D'Alessandro, A.M., Vento, M., Di Pietro, C., Amicarelli, F., and Tatone, C. (2014). SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human reproduction (Oxford, England)* 29, 2006-2017.
- Dong, J.W., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N.F., and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531-535.
- Downs, S.M., Daniel, S.A.J., and Eppig, J.J. (1988). INDUCTION OF MATURATION IN CUMULUS CELL-ENCLOSED MOUSE OOCYTES BY FOLLICLE-STIMULATING-HORMONE AND EPIDERMAL GROWTH-FACTOR - EVIDENCE FOR A POSITIVE STIMULUS OF SOMATIC-CELL ORIGIN. *J Exp Zool* 245, 86-96.
- Du, C., Lin, X., Xu, W., Zheng, F., Cai, J., Yang, J., Cui, Q., Tang, C., Cai, J., Xu, G., *et al.* (2018). Sulphydrated Sirtuin-1 Increasing Its Deacetylation Activity Is an Essential Epigenetics Mechanism of Anti-Atherogenesis by Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & redox signaling*.

Durlinger, A.L.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T.J., Grootegeed, J.A., and Themmen, A.P.N. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789-5796.

Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G., and Allshire, R.C. (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021-1032.

El Ramy, R., Magroun, N., Messadecq, N., Gauthier, L.R., Boussin, F.D., Kolthur-Seetharam, U., Schreiber, V., McBurney, M.W., Sassone-Corsi, P., and Dantzer, F. (2009). Functional interplay between Parp-1 and SirT1 in genome integrity and chromatin-based processes. *Cell Mol Life Sci* 66, 3219-3234.

Endo, T., Naito, K., Aoki, F., Kume, S., and Tojo, H. (2005). Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 71, 123-128.

Eppig, J.J., Schultz, R.M., O'Brien, M., and Chesnel, F. (1994). RELATIONSHIP BETWEEN THE DEVELOPMENTAL PROGRAMS CONTROLLING NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION OF MOUSE OOCYTES. *Dev Biol* 164, 1-9.

Erickson, G.F., and Sorensen, R.A. (1974). In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *The Journal of experimental zoology* 190, 123-127.

Fatoba, S.T., and Okorokov, A.L. (2011). Human SIRT1 associates with mitotic chromatin and contributes to chromosomal condensation. *Cell Cycle* 10, 2317-2322.

Faucher, D., and Wellinger, R.J. (2010). Methylated H3K4, a transcription-associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. *PLoS Genet* 6.

Findlay, J.K. (1993). AN UPDATE ON THE ROLES OF INHIBIN, ACTIVIN, AND FOLLISTATIN AS LOCAL REGULATORS OF FOLLICULOGENESIS. *Biol Reprod* 48, 15-23.

Ford, J., Jiang, M., and Milner, J. (2005). Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* 65, 10457-10463.

Frye, R.A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 260, 273-279.

Gahurova, L., Tomizawa, S.I., Smallwood, S.A., Stewart-Morgan, K.R., Saadeh, H., Kim, J., Andrews, S.R., Chen, T., and Kelsey, G. (2017). Transcription and chromatin determinants of de novo DNA methylation timing in oocytes. *Epigenetics & chromatin* 10, 25.

Ghosh, H.S., McBurney, M., and Robbins, P.D. (2010). SIRT1 Negatively Regulates the Mammalian Target of Rapamycin. *Plos One* 5, 8.

- Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S.J., Yao, M., Citterio, E., van Lohuizen, M., and Ganesan, S. (2011). BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol* 31, 1972-1982.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.
- Gondos, B., Westergaard, L., and Byskov, A.G. (1986). INITIATION OF OOGENESIS IN THE HUMAN-FETAL OVARY - ULTRASTRUCTURAL AND SQUASH PREPARATION STUDY. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 155, 189-195.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Guarente, L. (1999). Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nature Genet* 23, 281-285.
- Habbema, J.D.F., Eijkemans, M.J.C., Nargund, G., Beets, G., Leridon, H., and te Velde, E.R. (2009). The effect of in vitro fertilization on birth rates in western countries. *Hum Reprod* 24, 1414-1419.
- Haigis, M.C., and Guarente, L.P. (2006). Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20, 2913-2921.
- Han, C.F., Gu, Y.C., Shan, H., Mi, W.Y., Sun, J.H., Shi, M.H., Zhang, X.L., Lu, X.Z., Han, F., Gong, Q.H., *et al.* (2017). O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress. *Nat Commun* 8, 12.
- Han, S.J., Chen, R., Paronetto, M.P., and Conti, M. (2005). Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol* 15, 1670-1676.
- Hassold, T., and Chiu, D. (1985). MATERNAL AGE-SPECIFIC RATES OF NUMERICAL CHROMOSOME-ABNORMALITIES WITH SPECIAL REFERENCE TO TRISOMY. *Hum Genet* 70, 11-17.
- Hatta, M., and Cirillo, L.A. (2007). Chromatin opening and stable perturbation of core histone: DNA contacts by FoxO1. *J Biol Chem* 282, 35583-35593.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Chen, L.H., Li, Z.Y., Zwolinska, A.K., Smith, M.A., Cross, B., Koomen, J., Yuan, Z.M., Jenuwein, T., Marine, J.C., Wright, K.L., *et al.* (2010). MDM2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output. *Embo J* 29, 2538-2552.
- Jefferson, W.N., Couse, J.F., Padilla-Banks, E., Korach, K.S., and Newbold, R.R. (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: Evidence for ER beta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 67, 1285-1296.

- Jiang, L., Xiong, J., Zhan, J., Yuan, F., Tang, M., Zhang, C., Cao, Z., Chen, Y., Lu, X., Li, Y., *et al.* (2017). Ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7)-mediated deubiquitination of the histone deacetylase SIRT7 regulates gluconeogenesis. *The Journal of biological chemistry* 292, 13296-13311.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., and Tilly, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.
- Jones, K., Lane, S., and E. Holt Ph.D, J. (2013). Start and Stop Signals of Oocyte Meiotic Maturation.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.
- Kageyama, S., Liu, H.L., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2007). Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 133, 85-94.
- Kalmbach, K.H., Antunes, D.M.F., Kohlrausch, F., and Keefe, D.L. (2015). Telomeres and Female Reproductive Aging. *Semin Reprod Med* 33, 389-395.
- Keefe, D.L., Marquard, K., and Liu, L. (2006). The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18, 280-285.
- Keniry, A., Gearing, L.J., Jansz, N., Liu, J., Holik, A.Z., Hickey, P.F., Kinkel, S.A., Moore, D.L., Breslin, K., Chen, K., *et al.* (2016). Setdb1-mediated H3K9 methylation is enriched on the inactive X and plays a role in its epigenetic silencing. *Epigenetics & chromatin* 9, 16.
- Kerr, J.B., Duckett, R., Myers, M., Britt, K.L., Mladenovska, T., and Findlay, J.K. (2006). Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 132, 95-109.
- Kim, J.H., Seibel, M.M., Maclaughlin, D.T., Donahoe, P.K., Ransil, B.J., Hametz, P.A., and Richards, C.J. (1992). THE INHIBITORY EFFECTS OF MULLERIAN-INHIBITING SUBSTANCE ON EPIDERMAL GROWTH-FACTOR INDUCED PROLIFERATION AND PROGESTERONE PRODUCTION OF HUMAN GRANULOSA-LUTEAL CELLS. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 911-917.
- Kim, J.J., Gil, N.Y., Zhang, X.H., Chun, K.H., Fang, G., Kim, J., Cho, H., Jang, C.Y., and Cha, H.J. (2015). Sirt1 Regulates Microtubule Dynamics Through Negative Regulation of Plk1 in Mitosis. *Journal of cellular biochemistry* 116, 1888-1897.
- Kim, J.M., Liu, H.L., Tazaki, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol* 162, 37-46.
- Kishi, H., Kitahara, Y., Imai, F., Nakao, K., and Suwa, H. (2018). Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive medicine and biology* 17, 11-19.*

Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Van Thuan, N., Wakayama, S., Bui, H.T., and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and biophysical research communications* 340, 183-189.

Klein, N.A., Battaglia, D.E., Fujimoto, V.Y., Davis, G.S., Bremner, W.J., and Soules, M.R. (1996). Reproductive aging: Accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1038-1045.

Kops, G., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.

Kwak, S.S., Cheong, S.A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K.C., Jeung, E.B., and Hyun, S.H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* 78, 86-101.

Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-436.

Lee, W.S., Yoon, S.J., Yoon, T.K., Cha, K.Y., Lee, S.H., Shimasaki, S., Lee, S., and Lee, K.A. (2004). Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 69, 159-163.

Li, J.J., Sugimura, S., Mueller, T.D., White, M.A., Martin, G.A., Ritter, L.J., Liang, X.Y., Gilchrist, R.B., and Mottershead, D.G. (2015). Modifications of Human Growth Differentiation Factor 9 to Improve the Generation of Embryos From Low Competence Oocytes. *Mol Endocrinol* 29, 40-52.

Li, X., Liu, X., Gao, M., Han, L., Qiu, D., Wang, H., Xiong, B., Sun, S.C., Liu, H., and Gu, L. (2017). HDAC3 promotes meiotic apparatus assembly in mouse oocytes by modulating tubulin acetylation. *Development* 144, 3789-3797.

Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L., and Donovan, P.J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genet* 30, 446-449.

Ling, L., Hu, F., Ying, X., Ge, J., and Wang, Q. (2018). HDAC6 inhibition disrupts maturational progression and meiotic apparatus assembly in mouse oocytes. *Cell Cycle* 17, 550-556.

Liu, C., Song, Z., Wang, L., Yu, H., Liu, W., Shang, Y., Xu, Z., Zhao, H., Gao, F., Wen, J., *et al.* (2017). Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice. *Development* 144, 441-451.

- Liu, M.Y., Yin, Y., Ye, X.Y., Zeng, M., Zhao, Q., Keefe, D.L., and Liu, L. (2013). Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod* 28, 707-717.
- Liu, X.Q., Xie, F., Zama, A.M., Cao, B.Y., and Conti, M. (2014). Multiple Pathways Mediate Luteinizing Hormone Regulation of cGMP Signaling in the Mouse Ovarian Follicle. *Biol Reprod* 91, 11.
- Lucifero, D., Mann, M.R.W., Bartolomei, M.S., and Trasler, J.M. (2004). Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13, 839-849.
- Luo, J.Y., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D.L., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2 alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.
- Lv, S., Bu, W., Jiao, H., Liu, B., Zhu, L., Zhao, H., Liao, J., Li, J., and Xu, X. (2010). LSD1 is required for chromosome segregation during mitosis. *European journal of cell biology* 89, 557-563.
- Madgwick, S., and Jones, K.T. (2007). How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell division* 2, 4.*
- Mai, A., Valente, S., Meade, S., Carafa, V., Tardugno, M., Nebbioso, A., Galmozzi, A., Mitro, N., De Fabiani, E., Altucci, L., *et al.* (2009). Study of 1,4-Dihydropyridine Structural Scaffold: Discovery of Novel Sirtuin Activators and Inhibitors. *J Med Chem* 52, 5496-5504.
- Malhi, P.S., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., and Singh, J. (2007). Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction* 134, 233-239.
- Manosalva, I., and Gonzalez, A. (2010). Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology* 74, 1539-1547.
- Marteijn, J.A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lans, H., Schwertman, P., Gourdin, A.M., Dantuma, N.P., Lukas, J., and Vermeulen, W. (2009). Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J Cell Biol* 186, 835-847.
- Matzuk, M.M., Kumar, T.R., and Bradley, A. (1995). DIFFERENT PHENOTYPES FOR MICE DEFICIENT IN EITHER ACTIVINS OR ACTIVIN RECEPTOR-TYPE-II. *Nature* 374, 356-360.
- McBurney, M.W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J.R., Lansdorp, P.M., and Lemieux, M. (2003). The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38-54.
- McGrath, S.A., Esquela, A.F., and Lee, S.J. (1995). OOCYTE-SPECIFIC EXPRESSION OF GROWTH-DIFFERENTIATION FACTOR-IX. *Mol Endocrinol* 9, 131-136.
- Mehlmann, L.M., Jones, T.L.Z., and Jaffe, L.A. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a G(s) protein in the oocyte. *Science* 297, 1343-1345.

Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., *et al.* (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* *450*, 712-716.

Monk, M., and McLaren, A. (1981). X-CHROMOSOME ACTIVITY IN FETAL GERM-CELLS OF THE MOUSE. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* *63*, 75-84.

Moore, G.P., Lintern-Moore, S., Peters, H., and Faber, M. (1974). RNA synthesis in the mouse oocyte. *The Journal of cell biology* *60*, 416-422.

Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., and Guarente, L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* *116*, 551-563.

Mulligan, P., Yang, F.J., Di Stefano, L., Ji, J.Y., Ouyang, J., Nishikawa, J.L., Toiber, D., Kulkarni, M., Wang, Q., Najafi-Shoushtari, S.H., *et al.* (2011). A SIRT1-LSD1 Corepressor Complex Regulates Notch Target Gene Expression and Development. *Mol Cell* *42*, 689-699.

Nevoral, J., and Sutovsky, P. (2017). *Epigenome Modification and Ubiquitin-Dependent Proteolysis During Pronuclear Development of the Mammalian Zygote: Animal Models to Study Pronuclear Development*. *Animal Models and Human Reproduction*.

Ng, S.T., Chang, T.H., and Wu, T.C. (1999). Prediction of the rates of fertilization, cleavage, and pregnancy success by cumulus-coronal morphology in an in vitro fertilization program. *Fertility and sterility* *72*, 412-417.

Nihira, N.T., Ogura, K., Shimizu, K., North, B.J., Zhang, J.F., Gao, D.M., Inuzuka, H., and Wei, W.Y. (2017). Acetylation-dependent regulation of MDM2 E3 ligase activity dictates its oncogenic function. *Sci Signal* *10*, 11.

Norris, R.P., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Cowan, A.E., Simon, A.M., Paul, D.L., Lampe, P.D., and Jaffe, L.A. (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* *135*, 3229-3238.

Norris, R.P., Freudzon, M., Nikolaev, V.O., and Jaffe, L.A. (2010). Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction* *140*, 655-662.

Norris, R.P., Ratzan, W.J., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Krall, J., Movsesian, M.A., Wang, H.C., Ke, H.M., Nikolaev, V.O., and Jaffe, L.A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* *136*, 1869-1878.

North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD(+)-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* *11*, 437-444.

Obata, Y., and Kono, T. (2002). Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* *277*, 5285-5289.

Otsuka, F., McTavish, K.J., and Shimasaki, S. (2011). Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol Reprod Dev* 78, 9-21.

Otsuka, F., Moore, R.K., and Shimasaki, S. (2001). Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* 276, 32889-32895.
Pacchiarotti, J., Maki, C., Ramos, T., Marh, J., Howerton, K., Wong, J., Pham, J., Anorve, S.,

Chow, Y.C., and Izadyar, F. (2010). Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation* 79, 159-170.

Pacholec, M., Bleasdale, J.E., Chrnyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R.S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., *et al.* (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285, 8340-8351.

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., and Conti, M. (2008). Luteinizing hormone signaling in Preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol* 22, 924-936.

Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.L.C., and Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682-684.

Park, S.J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H.B., Ke, H.M., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A.L., *et al.* (2012). Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. *Cell* 148, 421-433.

Pavlok, A., Lucashahn, A., and Niemann, H. (1992). FERTILIZATION AND DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE OOCYTES DERIVED FROM DIFFERENT CATEGORIES OF ANTRAL FOLLICLES. *Mol Reprod Dev* 31, 63-67.

Peng, L., Yuan, Z., Li, Y., Ling, H., Izumi, V., Fang, B., Fukasawa, K., Koomen, J., Chen, J., and Seto, E. (2015). Ubiquitinated sirtuin 1 (SIRT1) function is modulated during DNA damage-induced cell death and survival. *The Journal of biological chemistry* 290, 8904-8912.

Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., *et al.* (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12, 1577-1589.

Pincus, G., and Enzmann, E.V. (1935). The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 62, 665-675.

Reed, N.A., Cai, D.W., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166-2172.

Ren, J.H., Chen, X., Zhou, L., Tao, N.N., Zhou, H.Z., Liu, B., Li, W.Y., Huang, A.L., and Chen, J. (2016). Protective Role of Sirtuin3 (SIRT3) in Oxidative Stress Mediated by Hepatitis B Virus X Protein Expression. *PLoS One* 11, e0150961.

- Richani, D., and Gilchrist, R.B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update* 24, 1-14.*
- Rodman, T.C., and Bachvarova, R. (1976). RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. *The Journal of cell biology* 70, 251-257.
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L.K., Plancha, C.E., and Albertini, D.F. (2009). Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproduction* 137, 709-720.
- Rossi, R., Portela, A., Passos, J.R.S., Cunha, E.V., Silva, A.W.B., Costa, J.J.N., Saraiva, M.V.A., Donato, M.A.M., Peixoto, C.A., Van den Hurk, R., *et al.* (2015). Effects of BMP-4 and FSH on growth, morphology and mRNA expression of oocyte-secreted factors in cultured bovine secondary follicles. *Anim Reprod* 12, 910-919.
- Salustri, A., Yanagishita, M., and Hascall, V.C. (1990). MOUSE OOCYTES REGULATE HYALURONIC-ACID SYNTHESIS AND MUCIFICATION BY FSH-STIMULATED CUMULUS CELLS. *Dev Biol* 138, 26-32.
- Sato, D., Itami, N., Tasaki, H., Takeo, S., Kuwayama, T., and Iwata, H. (2014). Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One* 9, e94488.
- Sauve, A.A., Celic, I., Avalos, J., Deng, H.T., Boeke, J.D., and Schramm, V.L. (2001). Chemistry of gene silencing: The mechanism of NAD(+)-dependent deacetylation reactions. *Biochemistry* 40, 15456-15463.
- Selesniemi, K., Lee, H.J., and Tilly, J.L. (2008). Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell* 7, 622-629.
- Shi, J., Yoshino, O., Osuga, Y., Nishii, O., Yano, T., and Taketani, Y. (2010). Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. *Fertility and sterility* 93, 1273-1279.
- Schatten, G., Simerly, C., Asai, D.J., Szoke, E., Cooke, P., and Schatten, H. (1988). ACETYLATED ALPHA-TUBULIN IN MICROTUBULES DURING MOUSE FERTILIZATION AND EARLY DEVELOPMENT. *Dev Biol* 130, 74-86.
- Schramm, R.D., Paprocki, A.M., and VandeVoort, C.A. (2003). Causes of developmental failure of in-vitro matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. *Hum Reprod* 18, 826-833.
- Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., and van den Hurk, R. (2009). Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71, 1193-1208.
- Smallwood, S.A., Tomizawa, S., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S.R., and Kelsey, G. (2011). Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature Genet* 43, 811-U126.

- Smith, J.J., Kenney, R.D., Gagne, D.J., Frushour, B.P., Ladd, W., Galonek, H.L., Israelian, K., Song, J., Razvadauskaite, G., Lynch, A.V., *et al.* (2009). Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction in vivo. *BMC Syst Biol* 3, 14.
- Stewart, M.D., Li, J.W., and Wong, J.M. (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol* 25, 2525-2538.
- Suzuki, A., Sugihara, A., Uchida, K., Sato, T., Ohta, Y., Katsu, Y., Watanabe, H., and Iguchi, T. (2002). Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16, 107-116.
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., and Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19, 815-826.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *The Journal of biological chemistry* 282, 6823-6832.
- Tatone, C., Di Emidio, G., Barbonetti, A., Carta, G., Luciano, A.M., Falone, S., and Amicarelli, F. (2018). Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Hum Reprod Update* 24, 267-289.
- Tomizawa, S., Nowacka-Woszek, J., and Kelsey, G. (2012). DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. *The International journal of developmental biology* 56, 867-875.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., and Greenberg, M.E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296, 530-534.
- Valerio, D., Luddi, A., De Leo, V., Labella, D., Longobardi, S., and Piomboni, P. (2018). SA1/SA2 cohesion proteins and SIRT1-NAD⁺ deacetylase modulate telomere homeostasis in cumulus cells and are eligible biomarkers of ovarian aging. *Human reproduction (Oxford, England)* 33, 887-894.
- van der Horst, A., Tertoolen, L.G.J., de Vries-Smits, L.M.M., Frye, R.A., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 279, 28873-28879.
- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., and Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450, 440-444.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Eagon, E.N., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.

- Vazquez, B.N., Thackray, J.K., Simonet, N.G., Kane-Goldsmith, N., Martinez-Redondo, P., Nguyen, T., Bunting, S., Vaquero, A., Tischfield, J.A., and Serrano, L. (2016). SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *The EMBO journal* 35, 1488-1503.
- Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C., and Hsueh, A.J.W. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62, 370-377.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* 10, 1223-1233.
- Wandji, S.A., Wood, T.L., Crawford, J., Levison, S.W., and Hammond, J.M. (1998). Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology* 139, 5205-5214.
- Wang, F., Tian, X.Z., Zhang, L., He, C.J., Ji, P.Y., Li, Y., Tan, D.X., and Liu, G.S. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 101, 577-+.*
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.
- Wang, H.B., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 8, 1207-1217.
- Wang, R.H., Sengupta, K., Li, C.L., Kim, H.S., Cao, L., Xiao, C.Y., Kim, S.S., Xu, X.L., Zheng, Y., Chilton, B., *et al.* (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14, 312-323.
- Wienken, M., Moll, U.M., and Dobbelstein, M. (2017). Mdm2 as a chromatin modifier. *J Mol Cell Biol* 9, 74-80.*
- Yamakuchi, M. (2012). MicroRNA regulation of SIRT1. *Front Physiol* 3, 8.
- Yang, G., Weng, X.Y., Zhao, Y.H., Zhang, X.J., Hu, Y.P., Dai, X., Liang, P., Wang, P., Ma, L.L., Sun, X.L., *et al.* (2017). The histone H3K9 methyltransferase SUV39H links SIRT1 repression to myocardial infarction. *Nat Commun* 8, 15.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14, 1053-1063.
- Zhang, K., Lu, Y., Jiang, C., Liu, W., Shu, J., Chen, X., Shi, Y., Wang, E., Wang, L., Hu, Q., *et al.* (2017). HDAC8 functions in spindle assembly during mouse oocyte meiosis. *Oncotarget* 8, 20092-20102.

- Zhang, L., Hou, X., Ma, R., Moley, K., Schedl, T., and Wang, Q. (2014). Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 1435-1445.
- Zhang, M.J., Su, Y.Q., Sugiura, K., Xia, G.L., and Eppig, J.J. (2010). Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes. *Science* 330, 366-369.
- Zhang, X.M., Li, L., Xu, J.J., Wang, N., Liu, W.J., Lin, X.H., Fu, Y.C., and Luo, L.L. (2013). Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene* 523, 82-87.
- Zhao, J., Taverne, M.A.M., Van der Weijden, G.C., Bevers, M.M., and Van den Hurk, R. (2001). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol Reprod Dev* 58, 287-296.
- Zheng, H., Huang, B., Zhang, B., Xiang, Y., Du, Z., Xu, Q., Li, Y., Wang, Q., Ma, J., Peng, X., *et al.* (2016). Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals. *Mol Cell* 63, 1066-1079.
- Zhou, X.L., Xu, J.J., Ni, Y.H., Chen, X.C., Zhang, H.X., Zhang, X.M., Liu, W.J., Luo, L.L., and Fu, Y.C. (2014). SIRT1 activator (SRT1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice via activating SIRT1 and suppressing mTOR signaling. *J Ovarian Res* 7, 12.
- Zilberman, Y., Ballestrem, C., Carramusa, L., Mazitschek, R., Khochbin, S., and Bershadsky, A. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* 122, 3531-3541.
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z.J., Luo, H.C., Sun, K.J., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L.J., Yu, Q.S., Zhang, Y., *et al.* (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 11, 631-U424.

* sekundární citace